

Imunossensores Eletroquímicos para o Diagnóstico Precoce e Descentralizado do Cancro da Mama

Raquel Cristina Barroso Marques

Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para
a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Computação e
Instrumentação Médica

Trabalho realizado sob a orientação do Doutor Hendrikus Petrus Antonius Nouws
e da Doutora María Begoña González-García

Outubro 2013

Para os meus país

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos
geralmente acontece”

Benjamín Disraeli

(1804 - 1881)

Agradecimentos

A Deus, por conduzir a minha vida e ser a minha força e alegria em todos os momentos!

À Prof.^a Doutora Cristina Delerue-Matos, por me ter dado a oportunidade e privilégio de participar neste projeto e trabalhar no laboratório GRAQ / REQUIMTE.

Ao Doutor Hendrikus Nouws, pela disponibilidade em me receber no projeto, pela orientação e ajuda em todo o trabalho e pelos ensinamentos que me transmitiu.

À Doutora María Begoña González-García, pela orientação, pelo ensino que me deu e pela paciência, pela ajuda em todas as fases do trabalho e pela disponibilidade que sempre demonstrou.

Aos meus colegas de laboratório, em especial de eletroquímica, pelo companheirismo e ajuda durante a realização do trabalho.

Aos meus amigos, pela preocupação, pela força que me transmitiram ao longo destes meses e por estarem presentes na minha vida, ouvindo os meus desabafos e partilhando comigo tanto os bons como os maus momentos.

Finalmente, quero agradecer aos meus pais pelo amor incondicional, ajuda e força que me têm dado. Pela paciência que tiveram comigo e principalmente pelo ânimo que me transmitiram durante a realização deste projeto, fazendo-me sempre acreditar nas minhas capacidades. Por serem os meus melhores amigos e por em tudo me apoiarem. Obrigada!

A todos os que direta ou indiretamente me apoiaram, o meu muito obrigada!

Esta tese foi suportada financeiramente pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através dos projetos PTDC/SAU-ENB/114786/2009 e PEst-C/EQB/LA0006/2013.

Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Entre as mulheres, o cancro da mama é o mais frequente. A deteção precoce do cancro é de extrema importância na medida em que pode aumentar as possibilidades de cura dos pacientes e contribuir para a diminuição da taxa de mortalidade desta doença. Um método que tem contribuído para a deteção precoce do cancro é a análise de biomarcadores. Biomarcadores associados ao cancro da mama, como o Recetor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2) e o Antígeno Carbohidratado 15-3 (CA 15-3), podem ser detetados através de dispositivos como os biossensores.

Neste trabalho foram desenvolvidos dois imunossensores eletroquímicos para a análise de HER2 e CA 15-3. Para ambos os sensores foram utilizados, como transdutores, eléctrodos serigrafados de carbono. A superfície destes transdutores foi nanoestruturada com nanopartículas de ouro.

Foram realizados imunoensaios não-competitivos (do tipo *sandwich*) em ambos os imunossensores, cuja estratégia consistiu na (i) imobilização do respetivo anticorpo de captura na superfície nanoestruturada dos eléctrodos, (ii) bloqueio da superfície com caseína, (iii) incubação com uma mistura do analito (HER2 ou CA 15-3) e o respetivo anticorpo de deteção biotinilado, (iv) adição de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (S-AP; a AP foi utilizada como marcador enzimático), (v) adição de uma mistura do substrato enzimático (3-indoxil fosfato) e nitrato de prata, e (vi) deteção do sinal analítico através da redissolução anódica, por voltametria de varrimento linear, da prata depositada enzimaticamente.

Com as condições experimentais otimizadas, foi estabelecida a curva de calibração para a análise de HER2 em soro, entre 15 e 100 ng/mL, obtendo-se um limite de deteção de 4,4 ng/mL. Para o CA 15-3 a curva de calibração (em solução aquosa) foi estabelecida entre 15 e 250 U/mL, obtendo-se um limite de deteção de 37,5 U/mL.

Tendo em conta o valor limite (*cutoff value*) estabelecido para o HER2 (15 ng/mL) pode-se comprovar a possível utilidade do imunossensor desenvolvido para o diagnóstico precoce e descentralizado do cancro da mama. No caso do CA 15-3 serão necessários estudos adicionais para se poder avaliar a utilidade do imunossensor para o diagnóstico do cancro da mama.

Palavras-chave: cancro da mama, biomarcadores, HER2, CA 15-3, imunossensor eletroquímico, eléctrodos serigrafados de carbono, nanopartículas de ouro

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Among women, breast cancer is the most frequent type of cancer. Early diagnosis of cancer is of the utmost importance because it can increase the chances of curing the patients and reduce the mortality rate. The analysis of cancer biomarkers has contributed to the early detection of cancers. Biomarkers associated with breast cancer, like Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) and Carbohydrate Antigen 15-3 (CA 15-3), can be detected using biosensors.

In this work, two electrochemical immunosensors were developed for the analysis of HER2 and CA 15-3. Screen-printed carbon electrodes, nanostructured with gold nanoparticles, were used as the transducers for both sensors.

Non-competitive (sandwich) immunoassays were used and consisted of the following steps: (i) immobilization of the respective capture antibody on the nanostructured transducer surface, (ii) blocking of the surface with casein, (iii) incubation with a mixture of analyte (HER2 or CA 15-3) and the respective (biotinylated) detection antibody, (iv) addition of streptavidin linked to alkaline phosphatase (S-AP; AP was used as the enzymatic label), (v) addition of the enzymatic substrate (3-indoxyl phosphate) and silver nitrate, and (vi) detection of the analytical signal through the anodic stripping of the enzymatically deposited silver by linear sweep voltammetry.

Using the optimized experimental conditions, the calibration curve for the analysis of HER2 in serum was established between 15 and 100 ng/mL, with a limit of detection of 4,4 ng/mL. For the analysis of CA 15-3 (in aqueous solution) the concentration range was between 15 and 250 U/mL, with a limit of detection of 37,5 U/mL.

Based on the established cutoff value for HER2 (15 ng/mL) it can be concluded that the developed electrochemical immunosensor could be a promising tool for the early and decentralized diagnosis of breast cancer. Regarding CA 15-3 additional studies will have to be performed in order to evaluate the immunosensor's utility in breast cancer diagnosis.

Keywords: breast cancer, biomarkers, HER2, CA 15-3, electrochemical immunosensor, screen-printed carbon electrodes, gold nanoparticles

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas	xix
Introdução.....	1
1.1. A Mama	4
1.2. Cancro da Mama.....	5
1.2.1. Tipos de Cancro da Mama.....	6
1.2.2. Métodos de Diagnóstico.....	7
1.3. Biomarcadores.....	10
1.3.1. Biomarcadores do Cancro da Mama.....	12
1.3.1.1. HER2.....	13
1.3.1.2. CA 15-3	14
1.4. Biossensores	15
1.4.1. Elementos de Reconhecimento.....	16
1.4.2. Transdutores	20
1.4.2.1. Transdutores Eletroquímicos.....	20
1.4.3. Biossensores Voltamétricos	21
1.4.3.1. Voltametria.....	21
1.4.3.2. Voltametria Cíclica e Voltametria de Varrimento Linear	22
1.4.3.3. Elérodos Serigrafados.....	24
1.4.3.4. Nanoestruturação de Elérodos	25
1.4.3.5. Imobilização dos Elementos de Reconhecimento.....	27
1.4.3.6. Imunossensores Voltamétricos	29
1.4.4. Métodos para a análise de CA 15-3 e HER2.....	30

Material e Métodos	33
2.1. Reagentes e Soluções.....	33
2.2. Equipamento e Material.....	34
2.2.1. Equipamento Geral.....	34
2.2.2. Equipamento Eletroquímico	34
2.2.3. Elétrodos Serigrafados de Carbono	35
2.3. Procedimentos Experimentais	36
2.3.1. Nanoestruturação dos SPCEs com Nanopartículas de Ouro	36
2.3.2. Imunoensaio Eletroquímico	37
2.3.2.1. Construção da Fase Biossensora.....	40
2.3.2.2. Análise de HER2 e CA 15-3	40
2.3.2.3. Registo do Sinal Analítico	41
Resultados e Discussão.....	43
3.1. Imunossensor para a Detecção do Biomarcador HER2	43
3.1.1. Modificação da Superfície do Transdutor com Nanopartículas de Ouro	43
3.1.2. Otimização da Fase Biossensora e do Imunoensaio.....	45
3.1.2.1. Otimização da Concentração de S-AP	45
3.1.2.2. Otimização das Etapas do Imunoensaio.....	46
3.1.2.3. Otimização das Concentrações dos Anticorpos de Captura e de Detecção para a Análise de HER2	48
3.1.3. Curvas de Calibração	49
3.1.3.1. Curva de Calibração - HER2 em tampão	49
3.1.3.2. Curva de Calibração - HER2 em soro	50
3.2. Imunossensor para a Detecção do Biomarcador CA 15-3	53
3.2.1. Otimização da Fase Biossensora e do Imunoensaio.....	53
3.2.1.1. Otimização das Concentrações dos Anticorpos de Captura e de Detecção para a Análise de CA 15-3	53
3.2.2. Curvas de Calibração	54

Conclusões e Perspetivas Futuras	59
Bibliografia	61

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Incidência de cancro na mulher, em Portugal (GLOBOCAN 2008) [5]	1
Figura 1.2 - Glândula mamária [1]	4
Figura 1.3 - Estrutura de um biossensor. Adaptada de [28, 29].....	16
Figura 1.4 - Proteína recetora [1]	17
Figura 1.5 - Estrutura de um anticorpo. Adaptada de [23]	18
Figura 1.6 - Instrumentação utilizada na análise amperométrica e voltamétrica	21
Figura 1.7 - Variação do potencial na voltametria cíclica [18].....	23
Figura 1.8 - Voltamograma cíclico de um sistema redox reversível [18]	23
Figura 1.9 - Orientações de anticorpos imobilizados aleatoriamente [46]	28
Figura 1.10 - Imobilização de anticorpos através de sistemas de bioafinidade [46]	29
Figura 1.11 - Imunoensaios: (A) Competitivo; e (B) <i>Sandwich</i> . Adaptada de [31]	30
Figura 2.1 - Potencióstato/galvanóstato PGSTAT101 (Metrohm Autolab) [71]	35
Figura 2.2 - Eléctrodo serigrafado de carbono [72]	35
Figura 2.3 - Conector DSC (DropSens) [72]	36
Figura 2.4 - Sistema eletroquímico utilizado.....	36
Figura 2.5 - Formato do imunoensaio “normal”	38
Figura 2.6 - Formato do imunoensaio otimizado.....	39
Figura 2.7 - Mecanismo da deposição catalisada de prata por AP para a detecção voltamétrica [75]	41
Figura 3.1 - Exemplo de um voltamograma de varrimento linear obtido no presente trabalho.....	43
Figura 3.2 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes concentrações de anticorpo de detecção (1, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e SPCEs modificados com AuNPs produzidas com $[\text{AuCl}_4]^-$	44
Figura 3.3 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes concentrações de S-AP (1×10^{-10} ; 2×10^{-10} ; 5×10^{-10} e 1×10^{-9} mol/L).....	45
Figura 3.4 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes estratégias de ensaio.....	46

Figura 3.5 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes estratégias de ensaio ('normal' e mistura HER2 com anticorpo de detecção).....	47
Figura 3.6 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes concentrações de Ab de captura (10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e de Ab de detecção (0,1; 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$).....	48
Figura 3.7 - Curva de calibração (i_p vs. $\log[\text{HER2}]$) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de HER2 em tampão.....	49
Figura 3.8 - Voltamogramas de varrimento linear (-0,03 V a +0.4 V, velocidade de varrimento: 50 mV/s) de análise de HER2 em soro humano [HER2] (ng/mL): 0, 15, 25, 50, 75 e 100 (aumento da i_p com aumento da concentração).....	50
Figura 3.9 - Curva de calibração (i_p vs. $\log[\text{HER2}]$) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de HER2 em soro humano.....	51
Figura 3.10 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes concentrações de Ab de captura (1, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e de Ab de detecção (1,5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$).....	54
Figura 3.11 - Curva de calibração (i_p vs. [CA 15-3]) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de CA 15-3 em tampão.....	55
Figura 3.12 - Curva de calibração (i_p vs. [CA 15-3]) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de CA 15-3 em tampão.....	55
Figura 3.13 - Voltamogramas de varrimento linear (-0,03 V a +0.4 V, velocidade de varrimento: 50 mV/s) de análise de CA 15-3 em tampão [CA 15-3] (U/mL): 15, 50, 125 e 250 (aumento da i_p com aumento da concentração).	56
Figura 3.14 - Curva de calibração (i_p vs. $\log[\text{CA 15-3}]$) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de CA 15-3 em tampão.....	57

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Classificação TNM. Adaptada de [25].....	7
Tabela 1.2 - Biomarcadores associados a diferentes tipos de cancro [7, 20].....	10
Tabela 3.1 - Intensidades de corrente de pico (i_p) para cada concentração de HER2 da curva de calibração.....	51
Tabela 3.2 - Características da curva de calibração e limite de deteção para a análise de HER2 em soro humano.....	52
Tabela 3.3 - Intensidades de corrente de pico (i_p) para cada concentração de CA 15-3 da curva de calibração.....	57
Tabela 3.4 - Características da curva de calibração e limite de deteção para a análise de CA 15-3 em solução aquosa.....	58

Lista de Abreviaturas

3-IP	3-Indoxil Fosfato (<i>3-Indoxyl Phosphate</i>)
Ab	Anticorpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AE	Eléctrodo Auxiliar (<i>Auxiliary Electrode</i>)
Ag	Antigénio
AP	Fosfatase Alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
ARN	Ácido Ribonucleico
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
BSA	Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CA 15-3	Antigénio Carbohidratado 15-3 (<i>Carbohydrate Antigen 15-3</i>)
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal In Situ
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CLIS	Carcinoma Lobular In Situ
CV	Voltametria Cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
EGFR	Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
HER2	Recetor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)
Ig	Imunoglobulinas
LOD	Limite de Deteção
NPs	Nanopartículas
RE	Eléctrodo de Referência (<i>Reference Electrode</i>)
S-AP	Estreptavidina - Fosfatase Alcalina (<i>Streptavidin - Alkaline Phosphatase</i>)
SPCE	Eléctrodo Serigrafado de Carbono (<i>Screen-Printed Carbon Electrodes</i>)
SPE	Eléctrodo Serigrafado (<i>Screen-Printed Electrodes</i>)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
WE	Eléctrodo de Trabalho (<i>Working Electrode</i>)

Capítulo 1

Introdução

Ao longo dos anos, vários têm sido os problemas de saúde que afetam a população mundial. Entre eles está o cancro. O cancro resulta do crescimento de células de uma forma descontrolada e muito rápida, afetando a formação de tecidos do corpo humano[1, 2].

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo tendo sido o responsável por 7,6 milhões de mortes em 2008[3].

Entre os cinco tipos mais comuns de cancro que afetam as mulheres, o cancro da mama é o mais frequente, responsável por 1,38 milhões de novos casos em 2008, o que corresponde a 23% de todos os tipos de cancro[4, 5]. No mesmo ano, foram diagnosticados, em Portugal, 5333 casos de cancro da mama em mulheres, o correspondente a 27,7% de todos os tipos de cancro, conforme se pode ver na Figura 1.1[5].

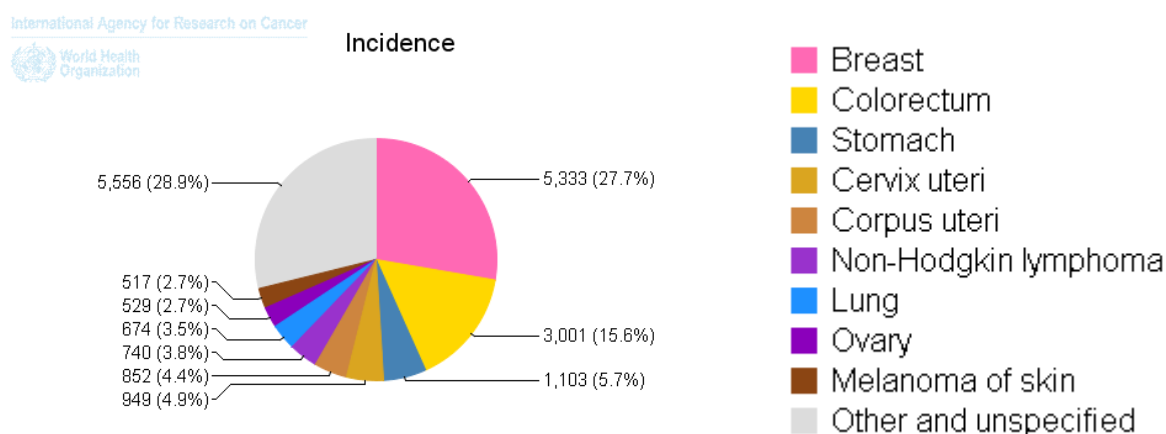


Figura 1.1 - Incidência de cancro na mulher, em Portugal (GLOBOCAN 2008)[5]

Apesar do cancro da mama ter alta incidência e mortalidade na mulher, também pode afetar os homens. Contudo, de todos os casos detetados em Portugal, apenas 1% corresponde a homens[6].

Sendo o cancro uma área de grande impacto na sociedade, o investimento na investigação que conduz à prevenção, diagnóstico e tratamento desta doença é inquestionável. Apesar de constantemente se descobrirem novos dados acerca do cancro, é importante encontrar soluções e desenvolver métodos de diagnóstico que permitam a deteção precoce do mesmo, uma vez que, quanto mais cedo o cancro for detetado, mais eficaz será o tratamento aplicado e maior a probabilidade de cura, o que consequentemente possibilita uma melhor qualidade de vida das pacientes e uma diminuição da taxa de mortalidade[7].

O diagnóstico do cancro da mama é feito, normalmente, através de exames radiológicos, como é o caso da mamografia. Se for detetada alguma anormalidade, como por exemplo um nódulo, pode ser necessária a realização de uma biópsia de forma a ser obtido um diagnóstico conclusivo, antes de se avançar com qualquer abordagem terapêutica. No entanto, todo o processo envolvido é demorado, pode ser invasivo e, por vezes, aquando da realização do diagnóstico, várias pacientes já apresentam metástases noutros órgãos[8]. Esta realidade conduziu a investigação no sentido de identificar as mudanças bioquímicas associadas ao cancro, o que levou a avanços na deteção e tratamento da doença[9]. Um método de elevada importância no diagnóstico precoce do cancro da mama é a deteção de marcadores tumorais, ou biomarcadores[10]. Estes biomarcadores são substâncias que se encontram no corpo quando o cancro está presente[11, 12]. Os biomarcadores presentes em fluídos biológicos, em especial no sangue, são os mais promissores para o desenvolvimento de métodos de rastreio[10]. Um simples teste de sangue que permita a deteção do cancro numa fase inicial pode evitar a morte de milhões de pessoas e reduzir o sofrimento dos pacientes e das suas famílias.

Um biomarcador é um indicador de um processo biológico normal ou de um processo que ocorre durante o desenvolvimento de uma doença, ou como resposta a um determinado medicamento durante uma intervenção terapêutica[13, 14]. Entre os diversos biomarcadores do cancro da mama estão o Antígeno Carbohidratado 15-3 (CA 15-3, do inglês *Carbohydrate Antigen 15-3*) e o Recetor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2, do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor 2*). Uma deteção de valores anormais destes biomarcadores no corpo humano, permitirá um diagnóstico precoce e uma rápida intervenção no tratamento da doença.

Dispositivos como os biossensores têm vindo a ser utilizados para a deteção dos biomarcadores. Os biossensores convertem uma interação bioquímica num sinal elétrico, ótico ou térmico mensurável e apresentam características como fácil utilização, portabilidade e robustez, permitindo a rápida análise de biomarcadores [7, 15, 16].

Um exemplo de biossensores utilizados na deteção de biomarcadores de cancro são os imunossensores eletroquímicos. Estes dispositivos combinam a formação do complexo gerado, a partir da interação entre um antigénio e um anticorpo, com a transdução eletroquímica, determinando a concentração do analito [17, 18].

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade dos biossensores e o seu desempenho, a área da Nanotecnologia tem vindo a desenvolver materiais que cumprem o pretendido [19]. Exemplo desses materiais são as nanopartículas de ouro. As nanopartículas (NPs) apresentam diâmetros inferiores a 100 nm e, devido ao seu tamanho e estabilidade, tornam-se vantajosas no diagnóstico do cancro [20].

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para a deteção dos biomarcadores de cancro da mama HER2 e CA 15-3. Para atingir este objetivo foram utilizados, como transdutores, elétrodos serigrafados de carbono (SPCE, do inglês *Screen-Printed Carbon Electrodes*) cuja superfície foi modificada com nanopartículas de ouro (AuNPs). Foi desenvolvido um imunoensaio não-competitivo (do tipo *sandwich*) e a deteção do produto da reação enzimática foi realizada por voltametria de varrimento linear.

1.1. A Mama

As mamas são órgãos glandulares que se localizam simetricamente na face anterior do tórax[1]. Verticalmente, estendem-se desde o 2º ao 6º arco costal e transversalmente, desde o rebordo do esterno à linha médio-axilar. São mantidas na sua posição pelos ligamentos suspensores de Cooper[21].

As glândulas mamárias têm como função a produção e secreção de leite para a amamentação. Cada glândula mamária é normalmente constituída por 15 a 20 lobos cobertos por tecido adiposo, o qual determina a forma da mama[1]. Cada lobo é constituído por vários lóbulos, os quais, por sua vez, contêm alvéolos. O leite é produzido nos lóbulos e segregado pelos alvéolos para determinados ductos, através dos canalículos. Estes ductos convergem formando os canais galactóforos, os quais são independentes entre si. Cada um destes canais termina à superfície do mamilo e está associado a um único lobo. Na zona proximal do mamilo, o canal galactóforo dilata e forma um pequeno reservatório chamado seio galactóforo, antes de se tornar mais estreito à medida que atravessa o mamilo e se abre à superfície do mesmo (Figura 1.2)[1, 21].

Ao longo da vida de uma mulher, a mama sofre alterações em função da idade, ciclo menstrual, toma de pílulas anticoncepcionais, fatores hormonais, gravidez ou menopausa.

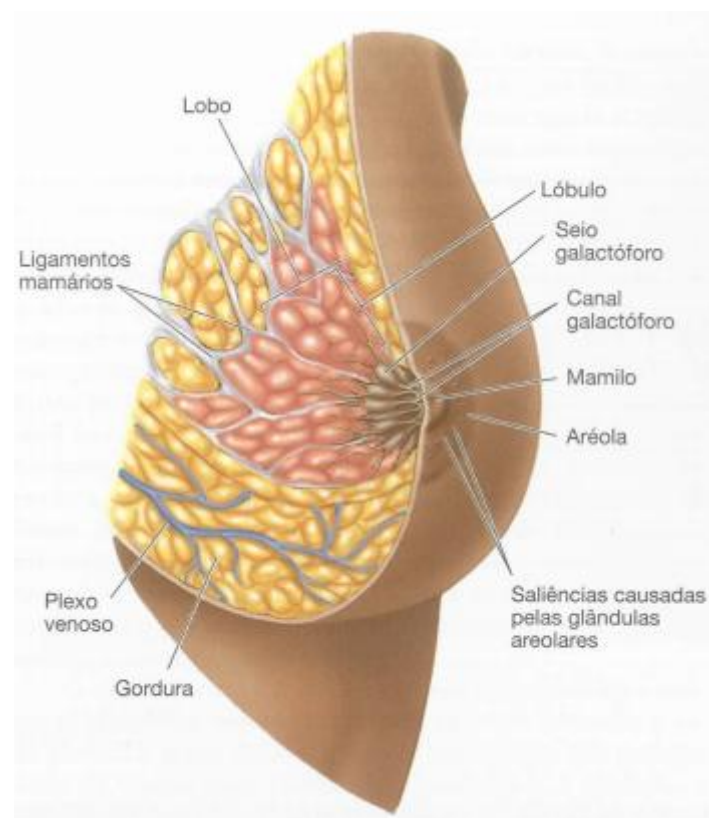


Figura 1.2 - Glândula mamária[1]

1.2. Cancro da Mama

O cancro, ao contrário do que se possa por vezes pensar, não é uma doença única. A ele estão associadas mais de 200 doenças que têm em comum o crescimento descontrolado de células e que podem afetar qualquer parte do corpo humano[7, 22].

Todo o corpo humano é composto por células. Desde que uma célula é formada até que se divide para originar duas novas células, ela passa pelo ciclo celular, o qual consiste de duas fases: a interfase e a divisão celular.

Durante a interfase, a célula desenvolve atividades metabólicas, realiza designadas funções e prepara-se para a divisão celular, processo durante o qual são produzidas novas células, importantes para o crescimento e regeneração de tecidos do corpo[1].

O processo de divisão celular ocorre de forma controlada e ordenada. A maioria das células cresce, divide-se e morre. Existem genes responsáveis pelas funções celulares básicas numa célula. Estes genes são os proto-oncogenes. No entanto, quando estes genes sofrem mutações (sejam elas mutações espontâneas ou em resposta a fatores ambientais como por exemplo, hábitos alimentares, exposição a radiação ou a substâncias carcinogénicas) tornam-se oncogenes, fazendo com que as células, em vez de morrerem, continuem a crescer e a formar células anormais, contribuindo assim para o desenvolvimento do cancro [1, 23, 24].

Devido a este crescimento descontrolado por parte das células, forma-se um conjunto, ou massa, de células anormais que não vão funcionar conforme o seu objetivo inicial. A esta massa dá-se o nome de tumor[23].

Um tumor pode ser benigno ou maligno. Nos tumores benignos as células permanecem localizadas, ou seja, não invadem outros tecidos, e o tumor apresenta limites claros. Este tipo de tumor não é considerado cancro e não coloca, normalmente, a vida do paciente em risco, embora por vezes seja necessária a sua remoção devido ao desenvolvimento de problemas de saúde relacionados com o seu tamanho e localização.

Por outro lado, os tumores malignos não apresentam uma forma bem delimitada e as células tumorais invadem e destroem tecidos vizinhos. Para além disto, podem ainda alastrar para outras partes do corpo, através dos vasos linfáticos ou da corrente sanguínea, dando origem a novos tumores, processo designado por metastização. Um tumor maligno é cancro[23, 24].

A denominação de um tipo de cancro é, na maioria dos casos, a mesma do órgão ou tipo de célula onde este se iniciou. Por exemplo, se o cancro teve início no pulmão, será denominado cancro do pulmão; se se inicia nos melanócitos, será denominado por melanoma[2]. O tipo de cancro que tem início nas células do tecido mamário é designado por cancro da mama.

1.2.1. Tipos de Cancro da Mama

Existem diversos tipos de cancro da mama, sendo o carcinoma ductal o mais comum, o qual tem início no revestimento dos ductos que levam o leite materno desde os lóbulos até ao mamilo. O termo carcinoma é utilizado para descrever o tipo de cancro que se desenvolve a partir das células epiteliais dos órgãos, como por exemplo a mama[2, 24].

O carcinoma ductal pode ser de dois tipos: *in situ* ou invasivo. O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) não é invasivo, ou seja, as células cancerígenas encontram-se nos ductos e não invadem outros tecidos da mama nem alastram para outros órgãos. Se não for tratado a tempo, o CDIS pode-se tornar invasivo. Por sua vez, o carcinoma ductal invasivo (CDI) invade os tecidos vizinhos e pode espalhar-se para outros órgãos através dos vasos linfáticos ou da corrente sanguínea[2, 24]. Existe também o carcinoma lobular que tem origem nos lóbulos. Assim como o carcinoma ductal, pode-se dividir em *in situ* ou invasivo. No carcinoma lobular *in situ* (CLIS), as células não crescem para além das paredes dos lóbulos. O CLIS não é considerado cancro. Já o carcinoma lobular invasivo (CLI) pode, à semelhança do CDI, alastrar para outros órgãos[24].

O cancro da mama pode ser dividido por estádios, sendo este um dos fatores importantes na determinação do prognóstico e consequente tratamento. O estágio está relacionado com a extensão e localização das células cancerígenas no organismo. O sistema de estadiamento utilizado é o sistema TNM (Tabela 1.1), o qual foi desenvolvido pelo AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) e pela UICC (*Union for International Cancer Control*), e cuja nomenclatura representa o tamanho do tumor (T), a dispersão dos gânglios linfáticos (N) e a existência de metástases (M)[25, 26].

Tabela 1.1 - Classificação TNM. Adaptada de [25]

Categoria T	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1-T4	Extensão e/ou tamanho do tumor primário
Categoria N	
NX	Gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástases em gânglios linfáticos regionais
N1-N3	Implicação de gânglios linfáticos regionais
Categoria M	
M0	Sem metástases à distância
M1	Existência de metástases à distância

O sistema TNM varia para cada tipo de cancro. Neste sentido, assim que cada categoria está definida, elas são combinadas e é lhes atribuído um estágio global que vai desde o estágio 0 ao estágio IV[25]. O estágio I representa o estágio menos avançado e o IV representa o estágio mais avançado. O estágio 0 corresponde ao cancro não invasivo, como o CDIS[24].

1.2.2. Métodos de Diagnóstico

Sendo o tipo de cancro mais frequente entre as mulheres, é essencial que o diagnóstico do cancro da mama seja realizado o mais cedo possível, a fim de evitar que o mesmo se espalhe para outros locais do corpo, aumentando assim as hipóteses de cura e a consequente recuperação da paciente.

A deteção e o diagnóstico do cancro da mama passam pela realização do exame clínico da mama e da mamografia, podendo, posteriormente, ser necessária a realização de outros exames como ecografia, ressonância magnética ou biópsia.

O exame clínico da mama é realizado por um profissional de saúde que procura diferenças nas mamas, como anormalidades no tamanho ou forma, ou se existem alterações na pele ou na zona do mamilo. Usando a ponta dos dedos das mãos, o examinador palpa as mamas para sentir a presença de nódulos e qual a localização dos mesmos[24]. Aquando da realização deste exame, devem também ser avaliados alguns fatores, considerados de risco, que estão associados ao desenvolvimento de cancro da mama.

Contudo, estes fatores de risco não são um indicador decisivo no que diz respeito ao desenvolvimento da doença na medida em que, existem mulheres, que podem apresentar até mais do que um fator de risco, mas que não chegam a desenvolver cancro da mama. Por outro lado, o contrário pode também ocorrer, ou seja, mulheres que podem vir a desenvolver a doença sem apresentarem qualquer fator de risco.

Existem fatores de risco que podem ser evitados enquanto que outros não. Alguns exemplos de fatores que não se podem evitar são a idade, ou seja, com o aumento da idade maior a probabilidade de desenvolver cancro da mama, histórico familiar, se na família de uma mulher existirem, ou tenham existido, casos de cancro da mama, maior a probabilidade de desenvolvimento da doença dessa mulher, alterações genéticas, caso de mutações em determinados genes como o BRCA 1 (do inglês *Breast Cancer 1*) e BRCA 2 (do inglês *Breast Cancer 2*), entre outros fatores. Ter uma gravidez tardia (após os 30 anos) ou nunca ter tido filhos, realização de terapia hormonal após a menopausa, excesso de peso ou obesidade após a menopausa são exemplos de outros fatores que aumentam o risco da mulher vir a desenvolver cancro da mama[6, 24].

A mamografia é uma radiografia da mama que permite a deteção de nódulos antes que estes possam ser sentidos na palpação. Permite também detetar calcificações, agregações de partículas de cálcio, que podem ser vistas na radiografia como pequenos pontos brancos. Mesmo que a mamografia apresente áreas anormais, como os nódulos ou as calcificações, não existe a certeza de que a paciente tenha cancro[6, 24].

Um outro exame que pode ser realizado é a ecografia (ultra-sons). É utilizado um transdutor, que é colocado sobre a pele, o qual emite ondas sonoras e recolhe o eco, sendo gerada uma imagem. Este exame pode ser realizado como complemento a uma mamografia pois permite perceber se um nódulo tem líquido ou se é uma massa sólida[6, 24].

Quando existe um elevado risco de uma mulher desenvolver cancro da mama, é recomendada, para além da mamografia, a realização de uma ressonância magnética. Como é um exame mais sensível que a mamografia, a possibilidade de ocorrência de falsos-positivos ao ser realizada uma ressonância magnética é também maior [24, 26].

Se a realização dos exames imagiológicos demonstrou a existência de áreas anormais, torna-se necessária a realização de uma biópsia para se obter um resultado conclusivo, antes de se avançar para o tratamento. Uma amostra da área suspeita é retirada e examinada ao microscópio por um patologista, que avaliará se se trata ou não de um tumor e quais as suas características como por exemplo, de que tipo é e se é, ou não, invasivo. Se se tratar de um tumor maligno, podem ser solicitados outros exames à paciente, como a radiografia do tórax ou a cintigrafia óssea, com o objetivo de verificar se o cancro alastrou para outras zonas no corpo, como por exemplo os pulmões ou os ossos, respetivamente[6, 24].

Quando é realizado o diagnóstico do cancro da mama, grande parte das pacientes já apresenta metástases, o que dificulta a realização de um tratamento eficaz da doença. Para que a taxa de sobrevivência aumente, é fundamental o desenvolvimento de métodos de deteção precoce do cancro da mama e de técnicas que permitam a monitorização da resposta do tumor aos tratamentos. Tendo em conta que muitos dos métodos de diagnóstico utilizados são invasivos e demorados, é crucial o desenvolvimento de outros métodos que sejam muito mais sensíveis e o menos invasivos possível[8]. Um dos métodos que possibilita a realização de um diagnóstico não invasivo é a análise de biomarcadores[7].

1.3. Biomarcadores

Conforme já foi referido anteriormente, um biomarcador é um indicador de um processo biológico normal ou de um processo que ocorre durante o desenvolvimento de uma doença, ou como resposta a um determinado medicamento durante uma intervenção terapêutica[13, 14]. Neste sentido, a análise dos biomarcadores pode ser de elevada importância no rastreio e acompanhamento de pacientes.

Os biomarcadores de cancro, também designados como marcadores tumorais, são estruturas que podem estar presentes no cancro ou que podem ser desenvolvidas pelo próprio tumor ou pelo organismo, em resposta à presença de cancro. Estes biomarcadores podem ser detetados nas células tumorais ou nos fluídos corporais, como o sangue ou a urina, de pacientes com cancro[7, 15, 22]. Modificações no ADN (ácido desoxirribonucleico), ARN (ácido ribonucleico), proteínas, oncogenes, entre outras alterações moleculares, estão incluídas nestes marcadores tumorais[7, 22].

Na Tabela 1.2 é apresentada uma lista de biomarcadores, que têm sido associados a diferentes tipos de cancro, tais como o CYFRA 21-1 (do inglês *Cytokeratin 19 Fragments*), CEA (do inglês *Carcinoembryonic Antigen*), p53 (do inglês *protein 53*), SCC (do inglês *Squamous Cell Carcinoma*), AFP (do inglês *Alpha-fetoprotein*), CA 125 (do inglês *Carbohydrate Antigen 125*), CA 19-9 (do inglês *Carbohydrate Antigen 19-9*), PSA (do inglês *Prostate Specific Antigen*).

Tabela 1.2 - Biomarcadores associados a diferentes tipos de cancro[7, 20]

Tipo de cancro	Biomarcador
Bexiga	CYFRA 21-1
Cólon	CEA, p53
Esófago	SCC
Fígado	AFP
Mama	CA 15-3, HER2, BRCA1, BRCA2
Ovário	CA 125
Pâncreas	CA 19-9, CEA
Próstata	PSA
Pulmão	CYFRA 21-1

Os biomarcadores podem ser utilizados para avaliar o risco que uma pessoa tem de vir a desenvolver cancro[7, 11]. Um exemplo de biomarcadores associados a um risco elevado de desenvolvimento de cancro é o dos genes BRCA1 e BRCA2. Conforme foi referido anteriormente, mutações nestes genes aumentam a probabilidade de desenvolvimento de cancro da mama numa paciente. É por isso importante a realização de exames de uma forma regular, a fim de se detetar o cancro numa fase inicial, facilitando o tratamento[11, 22].

Relativamente à utilização de biomarcadores no rastreio, o PSA é o mais comumente usado. Níveis aumentados deste biomarcador podem indicar a presença de cancro da próstata[7, 11, 27].

Os biomarcadores podem também ser utilizados como auxiliares no diagnóstico de cancro, na medida em que ajudam a determinar qual o seu local de origem [11, 27].

Após ter sido diagnosticado cancro a um paciente, os biomarcadores podem ser utilizados no prognóstico, auxiliando na decisão da abordagem terapêutica mais adequada ao tipo de cancro que foi diagnosticado[27, 28]. É importante ter em conta que alguns tipos de cancro são mais agressivos que outros, na medida em que podem crescer e espalhar-se mais rapidamente. Os níveis de um biomarcador podem ajudar a determinar se o tratamento a ser aplicado deve ser mais ou menos agressivo[27].

Para além disto, os biomarcadores podem ser utilizados para prever a resposta a um determinado tratamento ou para determinar qual o tratamento que apresenta maior probabilidade de ser eficaz[11, 22]. Por exemplo, pacientes com cancro da mama que apresentam uma sobre-expressão de HER2 podem ser tratadas com trastuzumab (Herceptin®), um anticorpo monoclonal recombinante humanizado anti-HER2, que inibe a proliferação das células deste tipo de cancro da mama[27, 28, 29].

Os biomarcadores são ainda úteis na monitorização do tratamento que está a ser aplicado. Analisando os níveis do biomarcador, é possível perceber se o tratamento está ou não a funcionar. Se os níveis do biomarcador aumentarem, o tratamento pode ter de ser alterado[27, 28].

Após a fase do tratamento, os biomarcadores podem também ser utilizados para detetar se houve uma reincidência do cancro[20, 27].

Um biomarcador ideal deve ser aquele que apenas está presente em pacientes com cancro e cuja quantificação reflete claramente o estado da doença, ou seja, quanto mais agressivo é o tumor, maiores os níveis apresentados[30]. No entanto, não existe ainda um biomarcador estabelecido clinicamente que respeite plenamente esta condição [20]. A maioria dos biomarcadores não são específicos para um tipo de cancro, ou seja, conforme se pode observar na Tabela 1.2, um biomarcador pode estar associado a mais do que um tipo de cancro e a maioria dos tipos de cancro pode também ter associado mais do que um biomarcador[31].

A análise dos biomarcadores pode ser efetuada através da utilização de biossensores, dispositivos que têm vindo a ser desenvolvidos para serem utilizados nas mais diversas áreas e com diversos objetivos, entre eles, o de realizar um diagnóstico precoce do cancro permitindo uma rápida intervenção no tratamento da doença. Os biossensores serão abordados mais à frente.

Avanços têm sido conseguidos na investigação genómica e proteómica, conduzindo à descoberta de novos biomarcadores[7, 27].

Embora os métodos genómicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) para a amplificação do ADN ou a sequenciação de ADN [22], estejam a ser utilizados na descoberta de biomarcadores, estes métodos são complexos, lentos e não são precisos o suficiente para aplicações clínicas. Assim, têm vindo a ser investigados biomarcadores proteicos para o diagnóstico do cancro, preferencialmente em relação aos marcadores genéticos[7, 31].

1.3.1. Biomarcadores do Cancro da Mama

O número de biomarcadores sugeridos para o cancro da mama tem vindo a aumentar. No entanto, a maioria deles não tem utilidade clínica. Os biomarcadores estabelecidos podem ser encontrados no tecido, como os recetores de estrogénio (ER, do inglês *Estrogen Receptor*) e progesterona (PR, do inglês *Progesterone Receptor*), ou na circulação, como o HER2 ou o CA 15-3. As células tumorais circulantes são biomarcadores emergentes que têm o potencial de se tornarem clinicamente úteis[32, 33].

1.3.1.1. HER2

O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*) faz parte de uma família de recetores de tirosina quinase. Esta família, também designada como ErbB ou HER (do inglês *Human Epidermal Growth Factor Receptor*), apresenta um importante papel na proliferação e crescimento das células e dela fazem parte, para além do EGFR (ErbB1 ou HER1), o HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4)[9, 33].

No cromossoma 17 localiza-se o proto-oncogene HER2, o qual codifica a proteína HER2 de peso molecular 185 kDa. Tanto a proteína HER2 como as restantes proteínas pertencentes à família HER, são transmembranares e apresentam três domínios: extracelular, transmembranar e citoplasmático, o qual contém a atividade da tirosina quinase[9, 34].

Esta família de recetores está envolvida nas vias de sinalização celular que vão conduzir à proliferação, crescimento e diferenciação das células, sendo este um processo essencial para a vida. No entanto, uma perda de controlo ocorrida nestas vias está normalmente associada a doenças como o cancro[34].

O processo ocorre, basicamente, da seguinte forma. Existem ligandos capazes de interagir com os recetores da família HER. Esta ligação provoca a ativação dos recetores e a consequente formação de dímeros que podem ser homodímeros ou heterodímeros, caso a formação seja feita com a mesma proteína ou com um outro membro da família, respetivamente[9]. Embora não seja conhecido nenhum ligando para o HER2, ele parece ser o recetor preferencial para a dimerização, por parte dos restantes membros [33, 35]. Desta forma, o domínio citoplasmático é conduzido à auto-fosforilação pela ativação da tirosina quinase, resultado da formação dos dímeros, sendo posteriormente desencadeada uma série de eventos que originam a transmissão de sinais que resultam na estimulação dos processos que envolvem a proliferação celular[9].

Se o domínio extracelular for fragmentado, verifica-se um aumento da fosforilação da região da tirosina quinase e consequentemente um crescendo dos níveis de sinalização. Ao entrar na corrente sanguínea, o domínio extracelular fragmentado pode-se tornar um indicador do aumento da expressão do HER2[34].

A sobre-expressão da proteína HER2 verifica-se em cerca de 20% a 30% dos cancros da mama invasivos e está associada a um fenótipo agressivo do cancro, ou seja, quanto mais elevados forem os níveis deste biomarcador, maior a probabilidade da paciente sofrer metástases e, conseqüentemente, a sobrevida é reduzida [20, 34, 35].

O valor limite deste biomarcador é de 15 ng/mL, ou seja, valores superiores indicam a presença de cancro no organismo da paciente[14, 36].

1.3.1.2. CA 15-3

A MUC-1 é uma proteína transmembranar que pertence ao grupo das mucinas. As suas funções passam pela lubrificação e proteção das superfícies epiteliais, proporcionando uma camada protetora. A MUC-1 apresenta três domínios: extracelular, transmembranar e citoplasmático.

Em condições normais a MUC-1 é expressa na superfície apical das células epiteliais. Ao ocorrer uma transformação maligna, a MUC-1 passa a ser expressa em níveis elevados em toda a superfície da célula [30, 37]. O domínio extracelular pode-se libertar para a matriz extracelular e seguir para o soro. A sobre-expressão da MUC-1 é, normalmente, associada à formação do cancro e de metástases [37, 38].

O CA 15-3 é um produto da MUC-1 [30, 38]. Num ensaio do CA 15-3, as moléculas que são detetadas são a forma solúvel da MUC-1 em soro [37]. Nestes ensaios, o CA 15-3 pode ser reconhecido por dois Abs monoclonais, 115D8 e DF3, num ensaio do tipo *sandwich*, onde o primeiro Ab funciona como anticorpo de captura e o segundo Ab funciona como anticorpo de deteção[37, 39].

Níveis elevados de CA 15-3 são encontrados em pacientes com cancro da mama[37]. Quanto mais agressivo for o tipo de cancro da mama, maior será a concentração do CA 15-3. Valores elevados deste biomarcador são encontrados em cerca de 75% das mulheres que têm cancro da mama invasivo[40]. O valor limite deste biomarcador é de 30 U/mL [36, 39, 41].

O CA 15-3 tem sido utilizado para monitorizar a resposta ao tratamento a que a paciente está a ser submetida[27, 29].

1.4. Biossensores

Os biossensores são dispositivos que combinam um componente biológico com um transdutor físico para a detecção de um determinado analito, ou conjunto de analitos, produzindo um sinal elétrico, ótico ou térmico proporcional à quantidade de analito existente numa determinada amostra [7, 20, 28].

O conceito básico de biossensor surgiu em 1962 com o trabalho desenvolvido por Leland C. Clark. Desde esse momento que o campo dos biossensores teve um crescimento notável com aplicações nas mais diversas áreas como a saúde, área alimentar e ambiente [42, 43].

Na área da saúde, um dos casos em que os biossensores têm sido utilizados é na detecção precoce do cancro. Os biossensores são utilizados para a detecção de biomarcadores e para a sua quantificação, auxiliando o médico na determinação do tipo de cancro e do seu estágio, para assim determinar o tratamento mais apropriado[28].

Quando se desenvolve um biossensor para o cancro existem alguns pontos a ter em conta. Por exemplo, quando o cancro se encontra numa fase inicial, as concentrações dos biomarcadores são muito baixas e a sua detecção torna-se difícil. Assim, os biossensores devem possuir elevada sensibilidade e limites de detecção baixos de forma a tornar esta detecção possível[20, 28]. O custo destes dispositivos também não deve ser elevado uma vez que podem ser utilizados para rastreio de um grande número de indivíduos[28].

Também é importante controlar a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos uma vez que, ao ocorrer um falso negativo, um paciente pode retornar à sua vida normal quando na realidade é necessária a realização de algum tipo de tratamento. No caso de se tratar de um falso positivo, o paciente pode passar por um período de ansiedade e até pânico, o qual pode ser ultrapassado com a realização de mais exames[28].

Para além de características como elevada sensibilidade, exatidão e precisão, baixo custo e fácil utilização, os biossensores apresentam também especificidade, rapidez, portabilidade e a possibilidade de analisar múltiplos analitos simultaneamente [7, 16].

Os biossensores são constituídos essencialmente por três elementos: o elemento de reconhecimento (componente biológico), o transdutor e o processador de sinal[29].

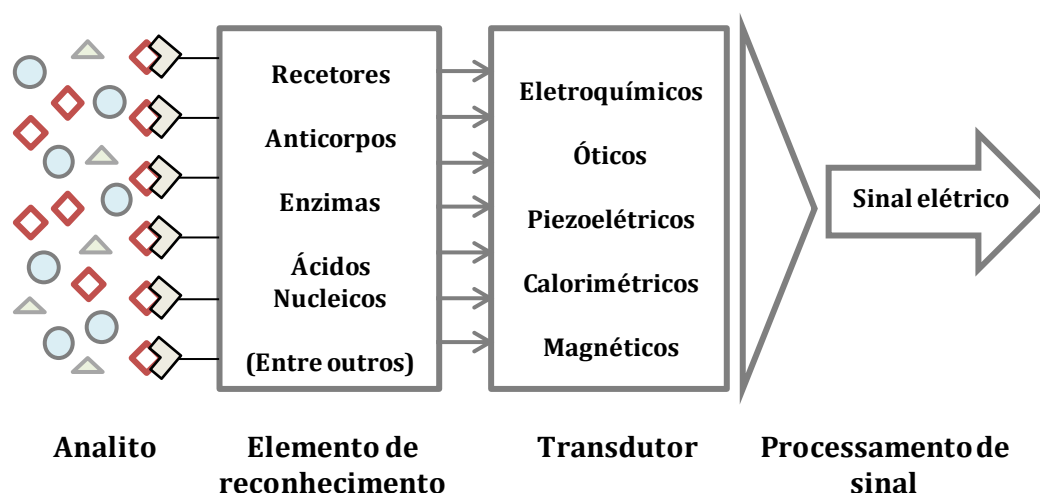


Figura 1.3 - Estrutura de um biossensor. Adaptada de [28, 29]

Conforme está representado na Figura 1.3, o analito é reconhecido pelo componente biológico (elemento de reconhecimento) através da formação de complexos do tipo enzima-substrato, antígeno-anticorpo, entre outros. O complexo formado gera sinais que são convertidos pelo transdutor num sinal elétrico, posteriormente analisado[17, 20]. No caso dos biossensores para o cancro, o analito são os biomarcadores[20, 29].

Após o sinal ser convertido, ele pode ser filtrado e amplificado, sendo posteriormente avaliado, para assim se obter uma conclusão acerca da amostra que foi analisada. No caso dos biossensores para o cancro, é importante conhecerem-se os valores limite (*cutoff values*) de cada biomarcador de forma a identificar se o cancro se encontra presente no organismo de um paciente e, caso esteja, em que fase se encontra, uma vez que pode estar numa fase inicial ou em franco desenvolvimento.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento de reconhecimento, de acordo com o transdutor utilizado ou de acordo com a combinação de ambos.

1.4.1. Elementos de Reconhecimento

O elemento de reconhecimento é um componente biológico que entra em contacto com o analito, sendo esta interação detetada pelo transdutor. É portanto um componente essencial do biossensor. Estes componentes biológicos podem ser extraídos da natureza ou podem ser alterados quimicamente. Com o avanço da tecnologia, vários elementos de reconhecimento utilizados atualmente são sintetizados em laboratório com o objetivo de aumentar a reprodutibilidade e estabilidade do biossensor[29, 44].

Os componentes biológicos utilizados como elementos de reconhecimento podem ser recetores, anticorpos, enzimas, ácidos nucleicos, entre outros.

Recetores

Os recetores (moléculas recetoras) são proteínas da membrana plasmática que possuem um local de ligação na superfície da célula ao qual se podem ligar moléculas específicas (ligandos), funcionando esta interação como um sinal estimulador de uma resposta (Figura 1.4)[1, 44].

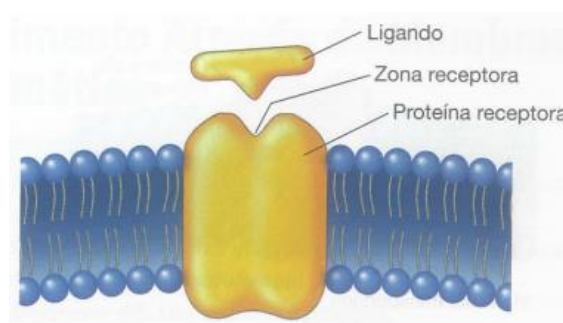


Figura 1.4 - Proteína recetora[1]

A ligação entre o recetor e o ligando pode desencadear diversos acontecimentos dentro da célula, os quais vão traduzir a interação química num sinal elétrico [18]. Alguns desses acontecimentos passam pela abertura ou fecho dos canais iónicos, alterações na permeabilidade da membrana ou a ativação de proteínas, como as proteínas G[44]. Por exemplo, fármacos que possuam uma estrutura parecida com a de ligandos específicos, podem competir com os mesmos com o objetivo de ocupar o recetor. Ao ligarem-se ao receptor, estes fármacos, dependendo das suas características, tanto podem ativar como inibir o recetor[1]. Os recetores são alvos para a administração de fármacos e úteis para o controlo de tratamentos do cancro[29].

Anticorpos

Os anticorpos (Ab), ou imunoglobulinas (Ig), produzidas pelas células B (linfócitos que amadurecem na medula óssea), são proteínas que circulam no sangue e em outros fluídos do corpo humano, e que têm a capacidade de estabelecer ligações específicas a grandes moléculas estranhas ao organismo, os antígenos (Ag), marcando-os para serem eliminados. Assim, o nosso organismo é protegido contra infeções provocadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas.

Um antígeno é qualquer molécula que provoca uma resposta imune[1, 23]. A parte de um antígeno que é reconhecida por um anticorpo, e através da qual se dá a interação anticorpo-antígeno, chama-se epítipo, sendo que um antígeno pode ter vários epítopos [45].

As imunoglobulinas são constituídas por 4 cadeias polipeptídicas: duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Estas cadeias são as responsáveis pela forma em Y dos anticorpos (Figura 1.5). As cadeias pesadas estão ligadas na haste do Y (região Fc, do inglês *Fragment-crystallizable*) pelas pontes dissulfídicas, enquanto que em cada braço do Y (região Fab, do inglês *Fragment antigen binding*) está ligada uma cadeia leve a uma cadeia pesada pelas mesmas pontes. Tanto na cadeia leve como na cadeia pesada existe uma região variável, numa extremidade, e uma região constante na outra extremidade. Diferentes imunoglobulinas apresentam regiões variáveis que variam na sequência de aminoácidos enquanto que as regiões constantes apresentam uma sequência parecida. O local de ligação dos antígenos, na região Fab do anticorpo, é formado pelas regiões variáveis das cadeias leves e pesadas, as quais também especificam qual o tipo de antígeno que se pode ligar[23].

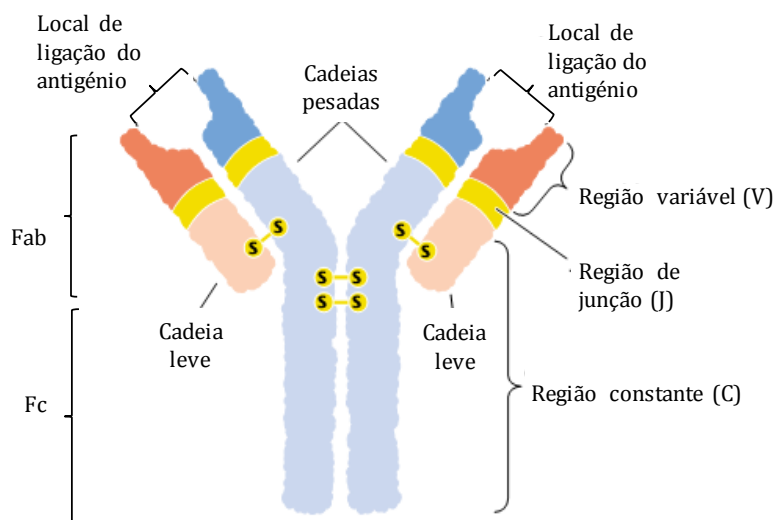


Figura 1.5 - Estrutura de um anticorpo. Adaptada de[23]

Existem 5 classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e cada uma é definida pelo tipo de cadeia pesada que possui[23].

Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. Os anticorpos monoclonais são produzidos a partir de um único clone de células produtoras de anticorpos. Assim, os anticorpos que são produzidos apresentam a mesma afinidade com o mesmo epítipo de um antígeno. Por outro lado, os anticorpos policlonais são produzidos a partir de diferentes células B, possuindo assim afinidade com vários epítopos de um antígeno[18].

A interação entre um anticorpo e um antígeno é muito específica e pode ser detetada por um tipo de dispositivos analíticos, os imunossensores, os quais têm sido utilizados para a detecção de biomarcadores[29, 31]. Um ponto importante no desenvolvimento destes dispositivos é a imobilização dos anticorpos na superfície do transdutor[46]. Os imunossensores e os métodos de imobilização são abordados mais à frente.

Enzimas

As enzimas são proteínas catalisadoras que aumentam a velocidade de uma reação química sem sofrerem alterações durante o processo[1]. Na aplicação de enzimas nos biossensores é monitorizado um dos reagentes ou produtos da reação (ou o efeito de inibição do analito). Estes elementos de reconhecimento são atrativos pois as enzimas apresentam elevada eficiência e seletividade. Quando se desenvolve um biossensor enzimático, um dos passos importantes é, à semelhança do que acontece com os anticorpos, a imobilização das enzimas. O objetivo é garantir um bom contacto entre a enzima e o transdutor, mantendo a estrutura e atividade biológica da enzima (estabilidade da enzima), garantir a estabilidade do sensor e um bom desempenho do mesmo, ou seja, uma elevada sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade e tempos de resposta curtos[18].

Um exemplo de um sensor enzimático é o sensor de glicose, o qual utiliza, como elemento de reconhecimento, a glicose oxidase[29].

Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos (ADN e ARN) são moléculas grandes constituídas por blocos unitários, os nucleótidos[1].

Um exemplo de biossensores que utilizam os ácidos nucleicos como elementos de reconhecimento têm, como princípio de funcionamento, a ligação entre as bases da cadeia de ADN, ou seja, ocorre a imobilização de uma cadeia simples de ADN (*ssDNA*, do inglês *single-stranded DNA*) na superfície de um transdutor para reconhecer, através do emparelhamento das bases, a sua sequência complementar, dando origem a um sinal elétrico[16, 18].

Este tipo de biossensores apresenta grande utilidade nas mais diversas áreas como: a área da saúde, no diagnóstico de doenças genéticas ou infecciosas; área alimentar, na detecção de organismos que contaminam alimentos; em investigações criminais[18].

1.4.2. Transdutores

O transdutor é o dispositivo responsável por converter a interação entre o analito e o elemento de reconhecimento num sinal mensurável[7].

Os transdutores podem ser baseados em processos eletroquímicos, óticos, de alteração de massa, calorimétricos ou magnéticos[7, 20]. Como neste trabalho foram utilizados transdutores eletroquímicos, somente as principais características destes transdutores são descritas a seguir. Informações mais detalhadas sobre os restantes transdutores podem ser encontradas na literatura[7, 29].

1.4.2.1. Transdutores Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos combinam a especificidade do processo de reconhecimento biológico com técnicas eletroquímicas e utilizam um eletrodo como elemento de transdução. O objetivo deste tipo de transdutor é converter o processo de reconhecimento biológico num sinal elétrico[18].

Estes dispositivos são dos mais utilizados, apresentando vantagens que permitem a sua aplicação na realização do diagnóstico de pacientes. A sua configuração é simples, são fáceis de utilizar, sensíveis, portáteis, de baixo custo e para além disso fornecem resultados precisos e exatos[7, 16, 29].

Os transdutores eletroquímicos podem ser divididos em potenciométricos, que medem a tensão, amperométricos e voltamétricos, que medem a corrente elétrica, ou condutimétricos, que medem a condutividade ou resistividade[47].

Os sensores eletroquímicos requerem sempre um circuito fechado, ou seja, a corrente elétrica deve ser capaz de fluir para permitir efetuar uma medição. Tendo em conta esta necessidade, o sensor necessita de, pelo menos, dois eletrodos.

Com os avanços que têm ocorrido nesta área, nos últimos anos têm sido utilizados eletrodos serigrafados (SPE, do inglês *Screen-Printed Electrodes*) no desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos. A tecnologia *screen-printing* permite a produção reprodutível em massa de eletrodos baratos e mecanicamente robustos[48]. Os eletrodos serigrafados de carbono (SPCE, do inglês *Screen-Printed Carbon Electrodes*) são um exemplo da aplicação desta tecnologia e apresentam a vantagem de permitirem a manipulação de volumes de amostra na ordem dos microlitros[49]. As características destes eletrodos são abordadas mais à frente.

1.4.3. Biossensores Voltamétricos

1.4.3.1. Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroquímica cujo objetivo é estabelecer uma relação entre a intensidade de corrente e o potencial numa célula eletroquímica. Esta célula é constituída por três elétrodo (elétrodo de trabalho, de referência e auxiliar) e um eletrólito ($V = 5-50 \text{ mL}$)[18].

O potencial do elétrodo de trabalho (WE, do inglês *Working Electrode*) é controlado e é neste elétrodo que ocorre o processo de interesse analítico. Quando o potencial deste elétrodo é deslocado a um valor aonde ocorre a oxidação ou a redução de uma espécie em solução, uma corrente flui entre o elétrodo e a solução[50]. Em condições controladas a intensidade desta corrente pode ser relacionada com a concentração do analito[47, 50]. Os outros elétrodo utilizados são o elétrodo de referência (RE, do inglês *Reference Electrode*), que fornece um potencial estável e reproduzível, e contra o qual é comparado o potencial do WE, e um elétrodo auxiliar (AE, do inglês *Auxiliary Electrode*). O controlo do potencial do WE em relação ao RE é efetuado com o uso de um potencióstato (Figura 1.6). Este potencióstato compara a diferença de potencial (ΔE), medida entre o WE e o RE, com o valor pretendido. Se esta diferença não for igual a zero, o potencióstato provoca uma mudança na fonte de alimentação de modo a eliminar a diferença. Portanto, entre o WE e o RE é aplicada uma diferença de potencial, enquanto que entre o WE e o AE é medida a intensidade de corrente.

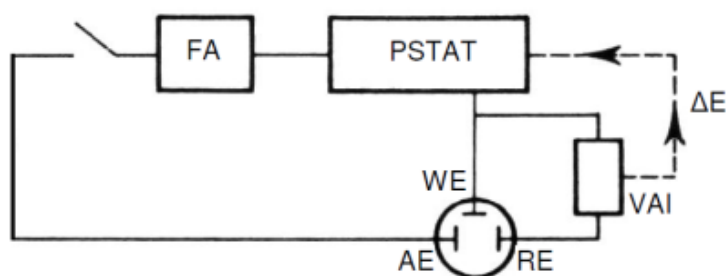


Figura 1.6 - Instrumentação utilizada na análise amperométrica e voltamétrica.

FA: fonte de alimentação; PSTAT: potencióstato; WE: elétrodo de trabalho; RE: elétrodo de referência; AE: elétrodo auxiliar; VAI: voltímetro de alta impedância; ΔE : diferença de potencial.

Adaptada de[51]

O potencial aplicado e a corrente medida são registados e é gerado um gráfico, da corrente em função do potencial, designado voltamograma, que permite identificar e quantificar as espécies químicas presentes numa mistura[47].

O material do eléctrodo de trabalho influencia bastante o desempenho do procedimento voltamétrico. Este eléctrodo deve proporcionar uma elevada razão sinal-ruído, assim como uma resposta reprodutível[18]. Os eléctrodos de trabalho utilizados são desenvolvidos de forma a terem uma elevada área de superfície para que possam estar em contacto com a maior quantidade de analito possível, produzindo assim um sinal mais elevado. Estes eléctrodos são feitos, normalmente, de metais, como o ouro ou a platina, ou de carbono. Podem também ser modificados de forma a melhorar a velocidade de reação e o seu tempo útil de utilização[47].

As técnicas voltamétricas apresentam várias vantagens, como por exemplo, uma elevada sensibilidade, uma ampla gama de linearidade entre a intensidade de corrente e a concentração do analito, tanto para espécies orgânicas como para inorgânicas, a possibilidade de determinação simultânea de diversos analitos, tempos de análise rápidos (segundos), e facilidade, tanto na aplicação de diferentes formas de varrimento de potencial, como na medição de baixas correntes[50].

Existem diversas técnicas voltamétricas, como a voltametria cíclica, voltametria de varrimento linear, voltametria de onda-quadrada, voltametria de impulso diferencial, entre outras[47, 50]. Para o trabalho realizado, apenas serão abordada a voltametria cíclica e a voltametria de varrimento linear.

1.4.3.2. Voltametria Cíclica e Voltametria de Varrimento Linear

A técnica mais utilizada para a aquisição de informação qualitativa acerca das reações eletroquímicas é a voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*). Esta técnica é bastante utilizada porque fornece rapidamente informações sobre (i) a termodinâmica e a cinética de processos redox, (ii) reações químicas acopladas e (iii) processos de adsorção [18].

A voltametria cíclica baseia-se na variação linear do potencial aplicado no eléctrodo de trabalho. O varrimento de potencial é efetuado de forma triangular (Figura 1.7), a uma determinada velocidade de varrimento, ao mesmo tempo que é medida a corrente.

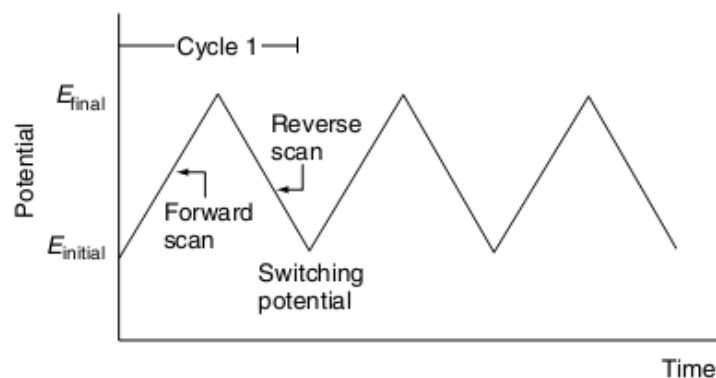


Figura 1.7 - Variação do potencial na voltametria cíclica [18]

A Figura 1.8 representa a resposta obtida durante um único ciclo para um sistema redox reversível. Conforme é possível observar no exemplo apresentado, inicialmente o varrimento do potencial é na direção catódica (negativa), com início num potencial onde não ocorre redução. Após a passagem pela região de potencial onde ocorre o processo de redução, a direção do varrimento do potencial é invertida, passando a ser na direção anódica (positiva), ocorrendo o respetivo processo de oxidação. Dependendo do tipo de análise que se pretende realizar, pode ser realizado um ciclo completo ou só parte de um ciclo, assim como uma série de ciclos[18, 50]. Quando só se realiza metade de um ciclo, i.e. varrimento linear num único sentido, a técnica é designada voltametria de varrimento linear.

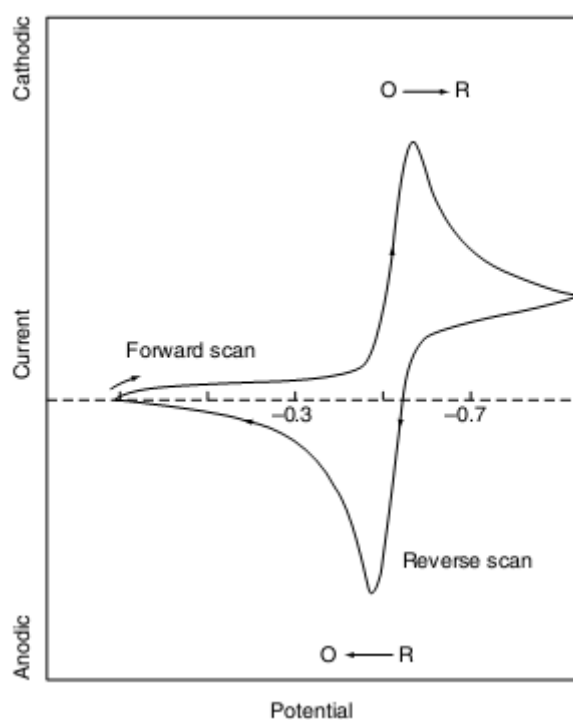


Figura 1.8 - Voltamograma cíclico de um sistema redox reversível [18]

1.4.3.3. Eléttodos Serigrafados

No desenvolvimento dos biossensores amperométricos e voltamétricos, os eléctrodos serigrafados apresentam vantagens devido a características como uma fabricação simples e de baixo custo, tamanho reduzido e reprodutibilidade, o que os tem tornado uma escolha comum no desenvolvimento deste tipo de sensores[49, 52].

Para a produção destes eléctrodos é utilizada a tecnologia *screen-printing*. Conforme já foi referido anteriormente, esta tecnologia permite a obtenção de eléctrodos mecanicamente robustos e versáteis que podem ter aplicações em campos muito variados devido às modificações que podem ser realizadas aquando da fabricação dos mesmos e da possibilidade de utilização de diferentes materiais[18, 49].

Na fabricação dos diversos eléctrodos serigrafados existem etapas que são comuns, embora eles possam ser produzidos com objetivos de utilização diferentes[49]. Resumidamente, o processo consiste em forçar as tintas, com as características adequadas à aplicação final, sequencialmente, de forma a evitar contactos indesejáveis, por crivos/máscaras que se encontram sobre um substrato. As máscaras utilizadas definem a geometria desejada para o eléctrodo.

Os custos de cada eléctrodo são relativamente baixos. Esta vantagem permite que, após a utilização, eles possam ser descartados, eliminando assim possíveis interferências que possam ocorrer com a reutilização dos mesmos[49].

Para a utilização nos sensores eletroquímicos, os eléctrodos mais atrativos são os fabricados utilizando tintas de carbono (SPCE), na medida em que apresentam baixa resistividade elétrica e um amplo intervalo de potenciais de trabalho. Têm uma estrutura cristalina, que gera baixas correntes residuais, e uma boa relação sinal-ruído[49].

Apesar destas vantagens, a capacidade que os SPCE têm para reter material proteico é muito baixa, uma vez que o carbono é relativamente inerte e difícil de modificar quimicamente. Para que seja possível imobilizar os elementos de reconhecimento, é necessário realizar uma modificação da superfície do eléctrodo[48]. Um dos métodos utilizados é a nanoestruturação com ouro, uma vez que o ouro apresenta maior reatividade química e afinidade para com material proteico o que vai permitir a imobilização de, por exemplo, um anticorpo de captura [49]. O ouro aumenta a sensibilidade do sensor e ao mesmo tempo não deixa que as proteínas se inativem.

1.4.3.4. Nanoestruturação de Elétrodos

A Nanotecnologia baseia-se na manipulação de matéria à escala atómica e molecular, ou seja, à nano-escala (escala do nanómetro (nm)), com o objetivo de desenvolver e utilizar materiais cujas dimensões variam numa escala de 1 a 100 nm. Com pelo menos uma das dimensões menor que 100 nm, os nanomateriais apresentam propriedades únicas[19, 20, 53].

A aplicação desta área científica tem aumentado exponencialmente nos últimos anos, o que tem permitido desenvolvimentos revolucionários nos diversos campos que a envolvem, como é o caso da Química, Biologia, Medicina, Engenharia, entre outras. O facto de ter uma natureza multidisciplinar, permite o seu desdobramento em diversos ramos. Um deles é o da Nanomedicina.

A Nanomedicina, como o próprio nome indica, é a aplicação à Medicina das nanotecnologias. Neste ramo, os nanomateriais são utilizados para a deteção, diagnóstico e acompanhamento de doenças, entre elas, o cancro. Por causa das suas propriedades físicas, óticas, químicas e magnéticas, que diferem bastante das que os materiais apresentam na sua forma à macroescala, os nanomateriais têm sido aplicados aos biossensores aumentando a sua biocompatibilidade, sensibilidade e precisão [20, 54]. Para além disso, também tornam possível a medição simultânea de múltiplos biomarcadores de cancro[55].

Alguns dos nanomateriais que têm vindo a ser amplamente utilizados são as nanoestruturas de carbono (nanotubos, nanofibras e grafeno), nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas, e os *quantum dots*. Para o trabalho realizado, serão abordadas apenas as nanopartículas de ouro (AuNPs).

As nanopartículas (NPs) podem ser orgânicas ou inorgânicas, metálicas, magnéticas ou até poliméricas. O tamanho que elas apresentam, assim como a carga e a estabilidade, tornam-nas úteis para o diagnóstico do cancro[20, 29]. Para além disto, também a elevada relação entre a área de superfície e o volume, disponível nas estruturas para a imobilização dos marcadores e dos elementos de reconhecimento, permite a amplificação do sinal e melhora a sensibilidade da medição[7, 31, 56].

O ouro é um material dúctil e maleável, é praticamente inerte em relação à maioria dos reagentes químicos e é um bom condutor do calor e da eletricidade. Devido a estas características, o ouro torna-se ideal para ser utilizado numa vasta gama de aplicações[49].

Tendo em conta que as AuNPs apresentam características como boa biocompatibilidade, excelente capacidade de condução e elevada razão superfície/volume, elas têm vindo a desempenhar um importante papel no desenvolvimento dos biossensores, proporcionando a melhoria do sinal obtido, um aumento na sensibilidade, devido às propriedades de condução, e baixos limites de deteção[49, 56, 57].

As condições em que as AuNPs são produzidas influenciam o seu tamanho, forma e, conseqüentemente, as suas propriedades[49, 58]. O método mais comum para sintetizar as AuNPs é através da redução de ouro em solução aquosa, utilizando o ião complexo tetracloroaurato(III) ($[\text{AuCl}_4]^-$) e diferentes agentes redutores. Este método foi descrito inicialmente por Turkevitch et al., em 1951[59], no qual foi utilizado, como agente redutor, o citrato, originando nanopartículas de ouro com cerca de 20 nm de diâmetro[49, 58, 60]. Cerca de 20 anos depois, em 1973, Frens [61] obteve, através do controlo da proporção entre o agente redutor e o composto de ouro, nanopartículas de ouro cujo tamanho varia de 16 a 147 nm. É neste método que se baseiam vários trabalhos desenvolvidos atualmente[49, 58]. Uma alternativa para a produção de AuNPs *in situ*, na superfície do eléctrodo, é através de deposição eletroquímica. Neste método é aplicada uma corrente constante para reduzir o ouro em solução. A nanoestruturação dos SPCEs com AuNPs foi descrita por Martínez-Paredes et al. [57]. A síntese de nanopartículas de ouro na superfície de um eléctrodo serigrafado, através de um método rápido e simples, contribui para o desenvolvimento de novos transdutores a serem utilizados em diversas aplicações de biossensores[57].

As nanopartículas têm sido usadas tanto como plataformas para a imobilização, como marcadores em imunossensores eletroquímicos[56]. Segundo o artigo de revisão de Boisselier e Astruc[60], o primeiro artigo científico sobre as nanopartículas de ouro foi escrito por Faraday, em 1857[62], enquanto que a primeira utilização das AuNPs como marcadores num imunossensor foi descrita por Dequaire et al. em 2000[63].

Na deteção de biomarcadores de cancro, os biossensores baseados nas nanopartículas, apresentam vantagens como baixo custo e a necessidade de uma baixa quantidade de amostra. Para além disso, a sensibilidade e a especificidade do biossensor podem ser aumentadas uma vez que as nanopartículas podem ser conjugadas com um anticorpo específico de um biomarcador[20].

1.4.3.5. Imobilização dos Elementos de Reconhecimento

Um dos passos fundamentais no desenvolvimento de um biossensor é a imobilização do elemento de reconhecimento na superfície do transdutor[47]. Por exemplo, num sensor enzimático pretende-se a imobilização das enzimas enquanto que num imunossensor pretende-se a imobilização do anticorpo/antigénio[18, 42, 64].

A imobilização é um processo que deve garantir um bom contacto entre o elemento de reconhecimento e o transdutor, a estabilidade do elemento de reconhecimento (i.e. manter a sua estrutura e atividade biológica), uma boa performance (elevada sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade e tempos de resposta curtos) e a estabilidade do sensor durante a seu tempo de vida útil[47].

Ao desenvolver, por exemplo, um imunossensor eletroquímico, durante o processo de imobilização, a forma de manter a conformação e a atividade da proteína que se pretende imobilizar, seja anticorpo ou antigénio, é o problema fundamental[46].

Vários métodos de imobilização têm sido descritos, tendo por base as propriedades físicas e químicas tanto do eletrodo, como da proteína[46]. A reprodutibilidade e sensibilidade do biossensor serão determinadas pelo método de imobilização[48]. A imobilização pode ser física, covalente ou orientada.

Imobilização física

A imobilização física baseia-se na adsorção das proteínas na superfície do eletrodo. Esta adsorção é realizada através de interações não-covalentes, principalmente a força eletrostática, ligações iónicas e interações hidrofóbicas[42, 46].

Este tipo de imobilização resulta normalmente numa orientação aleatória e em fracas ligações[46, 65].

Imobilização covalente

A formação das ligações covalentes é normalmente estabelecida entre os grupos funcionais expostos das proteínas e os eletrodos, devidamente modificados.

Apesar deste tipo de imobilização apresentar vantagens para o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos ainda é possível estabelecer melhorias. Aumentar a afinidade das proteínas imobilizadas é possível através da imobilização orientada e da utilização de nanomateriais[46].

Imobilização orientada

Um dos problemas associados à imobilização é a perda, completa ou parcial, da atividade da proteína, a qual pode acontecer devido, tanto a uma orientação aleatória, como a uma deformação estrutural. Com o intuito de melhorar o desempenho do imunossensor eletroquímico, a imobilização orientada torna-se fundamental. Neste tipo de imobilização, os elementos de captura são imobilizados de tal maneira que os seus locais de reconhecimento ficam expostos à solução da amostra e dispostos uniformemente.

No que diz respeito à imobilização orientada dos antigénios, não existem muitos estudos que abordem esse tema, talvez devido à diversidade de estruturas dos antigénios [46]. Bem diferente é o que acontece com a imobilização orientada dos anticorpos, a qual é fundamental na fabricação dos imunossensores eletroquímicos[46, 65].

Se na superfície do eletrodo os anticorpos se ligarem aleatoriamente, torna-se possível a formação de quatro tipos diferentes de orientações: ligação à superfície pela base do anticorpo (Figura 1.9 a), pela parte de cima do anticorpo (Figura 1.9 b), pelo lado do anticorpo (Figura 1.9 c) ou então todo o anticorpo ligado à superfície (Figura 1.9 d).

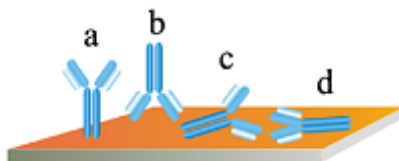


Figura 1.9 - Orientações de anticorpos imobilizados aleatoriamente[46]

No entanto, a orientação ideal é a representada na Figura 1.9 (a), na qual a região Fc do anticorpo é adsorvida na superfície do eletrodo e a região Fab, onde se localiza o local de ligação dos antigénios, fica orientada para a solução a analisar[46, 65].

A imobilização por bioafinidade é uma outra técnica de imobilização orientada e tem por base diferentes interações de bioafinidade. Alguns dos sistemas de bioafinidade que têm vindo a ser utilizados são o da avidina-biotina (Figura 1.10 g), proteínas A, G ou L (Figura 1.10 h), as quais se podem ligar com a região Fc de diferentes tipos de IgG, seletivamente e com alta afinidade, e a imobilização direcionada de ADN (Figura 1.10 i) [46, 65].

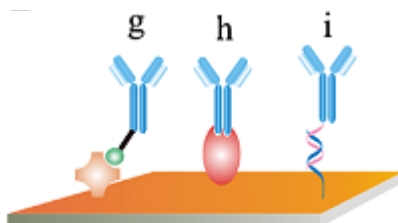


Figura 1.10 - Imobilização de anticorpos através de sistemas de bioafinidade [46]

1.4.3.6. Imunossensores Voltamétricos

Entre as diversas técnicas analíticas existentes para a identificação e determinação de elementos bioquímicos, os imunoenaios estão entre as mais específicas, os quais, para além de proporcionarem limites de deteção extremamente baixos, podem também ser usados para uma vasta gama de substâncias[18].

Os imunossensores são dispositivos capazes de detetar a interação entre um antígeno e um anticorpo, a partir da qual se forma o complexo anticorpo-antígeno (Ab-Ag)[17, 18, 52]. Os imunossensores voltamétricos combinam a formação do complexo anticorpo-antígeno com a transdução voltamétrica, determinando a concentração do analito[17, 18].

Como a maioria dos analitos (anticorpo ou antígeno) não são eletroquimicamente ativos, torna-se necessário recorrer a um marcador que permita a deteção do sinal[31]. Dependendo do tipo de ensaio, o marcador pode ser ligado ao antígeno ou ao anticorpo. Marcadores que possibilitam a deteção voltamétrica são, por exemplo, enzimas e catiões metálicos. Enzimas como a peroxidase de rábano-silvestre (HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*), a fosfatase alcalina (AP, do inglês *Alkaline Phosphatase*) ou a glicose oxidase, são as mais utilizadas neste tipo de imunossensor. No caso das enzimas, e após a interação imunológica, é adicionado um substrato adequado da enzima de modo a formar um produto com atividade eletroquímica, o qual pode ser analisado por voltametria [18, 31].

No presente trabalho, a enzima utilizada foi a AP e o respetivo substrato foi o 3-indoxil fosfato (3-IP).

Os imunoenaios podem ser competitivos ou não-competitivos (do tipo *sandwich*) (Figura 1.11). Num ensaio competitivo, o analito (antigénio na amostra) compete com um antigénio marcado com uma enzima, para a ligação ao anticorpo que está imobilizado. Depois de se dar a reação, o sensor é lavado para a remoção dos componentes que não reagiram. A seguir, o sensor é colocado numa solução que contém o substrato da enzima, sendo medido o produto da reação. O sinal medido é inversamente proporcional à concentração do analito na amostra, devido à natureza competitiva do ensaio[18, 31].

Por outro lado, num ensaio do tipo *sandwich* são utilizados dois anticorpos diferentes que se ligam a um antigénio específico. Ao anticorpo que está imobilizado na superfície do eletrodo (anticorpo de captura) liga-se o antigénio, ao qual se liga a seguir o anticorpo marcado com uma enzima (anticorpo de deteção). Após o sensor ser lavado, é colocado numa solução que contém o substrato da enzima e a reação enzimática é monitorizada eletroquimicamente[18]. Este tipo de ensaio apresenta vantagens como alta especificidade e alta sensibilidade devido à utilização de dois anticorpos[31].

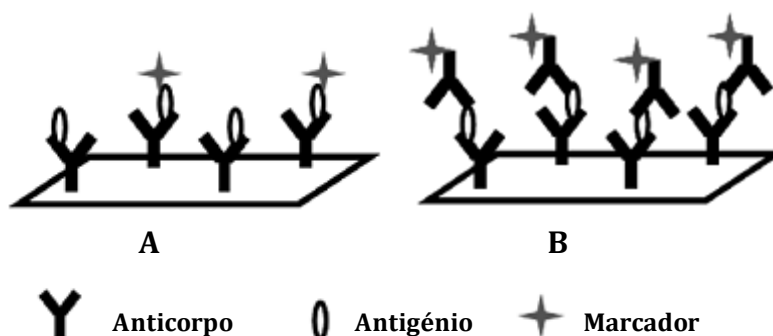


Figura 1.11 - Imunoenaios: (A) Competitivo; e (B) *Sandwich*. Adaptada de[31]

1.4.4. Métodos para a análise de CA 15-3 e HER2

O método mais amplamente utilizado na análise de biomarcadores de cancro é o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)[31]. Embora o ELISA permita a deteção de proteínas em níveis elevados, encontrados em fases avançadas do cancro, este método não permite a deteção de concentrações baixas dos biomarcadores, correspondentes à fase inicial da doença. Por esta razão, é importante o desenvolvimento de dispositivos que permitam colmatar esta desvantagem[7, 16, 31].

Ao longo dos anos, vários têm sido os artigos publicados sobre o desenvolvimento de dispositivos/métodos alternativos para a detecção de biomarcadores de cancro, assim como vários artigos de revisão[43].

Yang et al. [40] desenvolveram um imunoensaio eletroquímico para a detecção do biomarcador CA 15-3. Para a preparação do imunossensor foi fabricada uma interface composta por azul de Prússia (PB, do inglês *Prussian Blue*) – AuNPs – ADN – AuNPs. Os anticorpos anti-CA 15-3 foram adsorvidos na superfície das AuNPs. O desempenho e os fatores que influenciam o funcionamento do imunossensor foram otimizados, apresentando uma gama linear de 1 a 240 ng/mL para a detecção do CA 15-3 e um limite de detecção de 0,6 ng/mL.

Al-Khafaji et al.[34] desenvolveram um imunoensaio eletroquímico para a detecção do HER2, baseado num formato do tipo *sandwich*. Um anticorpo monoclonal anti-HER2 de captura foi imobilizado numa partícula magnética modificada com proteína A. O HER2 que se encontra na amostra é capturado pelas partículas modificadas e o ensaio em formato *sandwich* é realizado pela adição de um segundo anticorpo monoclonal anti-HER2, marcado com biotina. Para a detecção eletroquímica, por voltametria de impulso diferencial, foi utilizada a enzima AP conjugada com estreptavidina e o seu substrato. O imunoensaio apresentou um limite de detecção de 6 ng/mL.

Ge et al.[66] desenvolveram um imunossensor eletroquímico para a detecção de três biomarcadores de cancro: CA 15-3, CA 125 e CEA. Para a modificação da superfície do imunossensor foi utilizado grafeno (GR). A imobilização do anticorpo de captura foi possível através da síntese das AuNPs sobre a superfície do eléctrodo modificada com GR. Após a incubação com a amostra, foi adicionado um segundo anticorpo marcado com AP. De seguida adicionou-se um substrato da enzima (3-indoxil fosfato) e catiões prata. A reação enzimática levou à deposição de prata (metálica) no eléctrodo. A prata assim depositada foi redissolvida utilizando a voltametria de varrimento linear. O limite de detecção para o CA 15-3 foi de $1,5 \times 10^{-3}$ U/mL, para o CA 125 foi de $3,4 \times 10^{-4}$ U/mL e para o CEA foi de $1,2 \times 10^{-3}$ ng/mL.

Para além dos exemplos apresentados, existem outros artigos publicados sobre o desenvolvimento de dispositivos para a análise dos biomarcadores CA 15-3[39, 41, 67, 68, 69] e HER2 [70]. No entanto, esta é uma área que se encontra em constante desenvolvimento e por isso, conforme foi referido anteriormente, vários são os trabalhos que se podem encontrar na literatura.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes para a execução do trabalho experimental foram de qualidade "pro análise" (p.a.), ou equivalente, e foram utilizados sem purificação adicional. Tris(hidroximetil)aminometano (Tris; $\geq 99.8\%$), nitrato de magnésio hexahidratado (99%), ácido nítrico ($\geq 65\%$), ácido clorídrico (37%), albumina de soro bovino (BSA; $\geq 98\%$), β -caseína de leite bovino ($\geq 98\%$), sal dissódico de 3-indoxil fosfato (3-IP; $\geq 98\%$), estreptavidina ligada a fosfatase alcalina (S-AP; estreptavidina de *Streptomyces avidinii*), soro humano (de sangue AB masculino), e ácido tetracloroaurico(III) (99.999%) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Nitrato de prata (99.9995%) foi fornecido pela Alfa Aesar.

Os imunoreagentes foram adquiridos à Sino Biological Inc., para os ensaios do HER2, e à Fujirebio Diagnostics para os ensaios do CA 15-3. Os reagentes empregues para o HER2 foram: anticorpo monoclonal (coelho) anti-HER2 humano (anticorpo de captura; 720 $\mu\text{g/mL}$ ou 290 $\mu\text{g/mL}$ (dependendo do lote)), HER2 recombinante humano (antigénio; 200 $\mu\text{g/mL}$), e anticorpo monoclonal (rato) anti-HER2 humano biotinizado (anticorpo de detecção; 500 $\mu\text{g/mL}$). Os reagentes utilizados para a análise do CA 15-3 foram: anticorpo monoclonal (rato) anti-CA 15-3 humano (anticorpo de captura Ma552; 2300 $\mu\text{g/mL}$), padrões de CA15-3 (antigénio; 0, 15, 50, 125 e 250 U/mL), anticorpo monoclonal (rato) anti-CA 15-3 humano biotinizado (anticorpo de detecção; 2,5 $\mu\text{g/mL}$). Os últimos dois reagentes (antigénio e anticorpo de detecção) fazem parte do CanAg CA 15-3 EIA kit da Fujirebio Diagnostics.

A maior parte das soluções foram preparadas com água ultra-pura (resistividade = 18,2 M Ω .cm), obtida de um sistema de purificação da Millipore (Simplicity 185), ou com soluções tampão, as quais foram também preparadas com esta água.

Foram utilizadas duas soluções tampão Tris-HNO₃: tampão 1: 0,10 mol/L (pH 7,2) e tampão 2: 0,10 mol/L (pH 9,8) com $2,0 \times 10^{-2}$ mol/L MgNO₃.

Para preparar as soluções (na altura da sua utilização) de BSA (2%), de β -caseína (2%), de S-AP, dos imunoreagentes para a análise do HER2, e do anticorpo de captura Ma552 para o CA 15-3 foi utilizada a solução tampão 1. As soluções do substrato enzimático (3-IP; $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), contendo nitrato de prata ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L), foram preparadas com o tampão 2. As soluções do anticorpo de deteção, para a análise do CA 15-3, foram preparadas através de diluição da solução mãe com a solução de diluição incluída no CanAg CA 15-3 EIA kit. As soluções de $[\text{AuCl}_4]^-$ ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L), para a formação das AuNPs, foram preparadas através da diluição de uma solução de $[\text{AuCl}_4]^-$ $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L com HCl (0,1 mol/L).

2.2. Equipamento e Material

2.2.1. Equipamento Geral

Para a medição de líquidos e preparação das soluções, foi utilizado material corrente de laboratório (balões volumétricos, pipetas Pasteur, etc.) e micropipetas VWR Signature™ de 20 μL , 200 μL e 1000 μL . As medições do pH das soluções foram efetuadas com um medidor de pH (Crison, GLP 22), com um eletrodo de vidro da mesma marca. Para as diversas pesagens dos reagentes sólidos foi utilizada uma balança analítica da marca Mettler Toledo (modelo MS205DU).

2.2.2. Equipamento Eletroquímico

Todos os ensaios eletroquímicos foram realizados utilizando um potencióstato/galvanóstato modelo PGSTAT101, da marca Metrohm Autolab (Figura 2.1). O software NOVA (v. 1.9; Metrohm Autolab) foi utilizado para o controlo do potencióstato e para a aquisição e tratamento de dados.



Figura 2.1 - Potencióstato/galvanóstato PGSTAT101 (Metrohm Autolab)[71]

2.2.3. Eléttodos Serigrafados de Carbono

Os eléctrodos utilizados como transdutores dos imunossensores foram SPCEs (Figura 2.2; DropSens, DRP-110). Estes SPCEs apresentam três eléctrodos serigrafados sobre um substrato cerâmico de dimensões 3,4 x 1,0 x 0,05 cm. Os contactos eléctricos e o eléctrodo de referência são feitos com uma tinta de prata. O eléctrodo de trabalho, assim como o eléctrodo auxiliar, é de carbono e apresenta uma forma circular com um diâmetro de 4 mm[72]. Em torno do eléctrodo de trabalho existe uma camada, em forma de anel, que constitui o reservatório (50µL) da célula eletroquímica[73]. A célula eletroquímica dos SPCEs, que permite assim a utilização de volumes de aproximadamente 40-50 µL, e as extremidades das ligações, que fazem a conexão do SPCE ao potencióstato, estão expostas; por outro lado, as ligações em si estão cobertas com uma camada de isolamento[49].

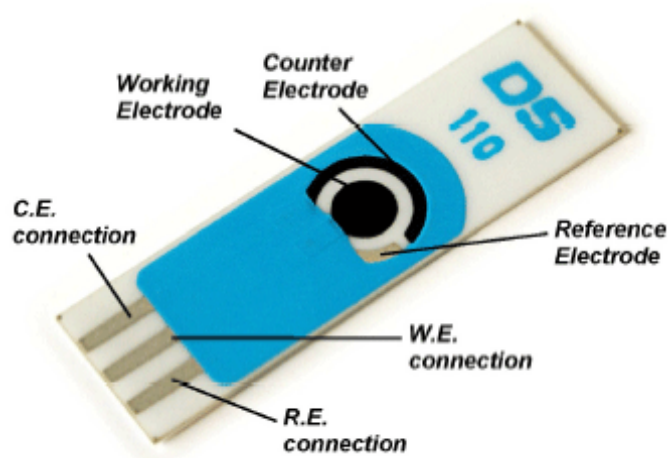


Figura 2.2 - Eléttodo serigrafado de carbono [72]

Foi utilizado um conector específico ($8,0 \times 4,0 \times 3,5$ cm) (Figura 2.3; DropSens, DSC) para ligar os SPCEs ao potenciômetro (Figura 2.4).



Figura 2.3 - Conector DSC (DropSens)[72]



Figura 2.4 - Sistema eletroquímico utilizado

2.3. Procedimentos Experimentais

2.3.1. Nanoestruturação dos SPCEs com Nanopartículas de Ouro

Para a nanoestruturação da superfície do WE do SPCE com AuNPs foi utilizado um método baseado na eletrodeposição de ouro, o qual foi publicado anteriormente[57]. Os eletrodos foram lavados com água ultra-pura e a seguir colocaram-se, na célula do SPCE, 40 μL de uma solução de $[\text{AuCl}_4]^-$ ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L ou $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L).

A formação das AuNPs foi efetuada através da aplicação de uma intensidade de corrente de $-5 \mu\text{A}$ durante 60 s (para a concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) ou de $-100 \mu\text{A}$ durante 240 s (para a concentração de $[\text{AuCl}_4]^-$ de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$). No último caso foi ainda aplicado um potencial de $+0,1 \text{ V}$, durante 120 s, com o fim de libertar o hidrogénio que se gera na superfície do eletrodo durante a eletrodeposição. Neste caso o tamanho das AuNPs obtidas é de $73 \pm 20 \text{ nm}$ [57]. Os SPCEs foram de seguida lavados com a solução tampão 1.

2.3.2. Imunoensaio Eletroquímico

Os imunoensaios realizados ao longo do trabalho consistiram, inicialmente e após a nanoestruturação dos SPCE com AuNPs, das seguintes etapas: (1) imobilização do anticorpo (anti-HER2 ou anti-CA 15-3) de captura na superfície dos eletrodos, (2) bloqueio da superfície com caseína, (3) adição do analito (HER2 ou CA 15-3), (4) adição do respetivo anticorpo de deteção biotinilado, (5) adição de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (S-AP), (6) adição de uma mistura do substrato enzimático (3-IP) e nitrato de prata, e (7) deteção do sinal analítico através da redissolução anódica, por voltametria de varrimento linear, da prata depositada enzimaticamente. Na Figura 2.5 é representado este ensaio "normal".

Após a otimização da modificação da superfície do transdutor com AuNPs e da concentração da S-AP, as etapas 3 e 4 (referidas em cima) foram combinadas (Figura 2.6), tendo sido este o procedimento adotado para o restante trabalho.

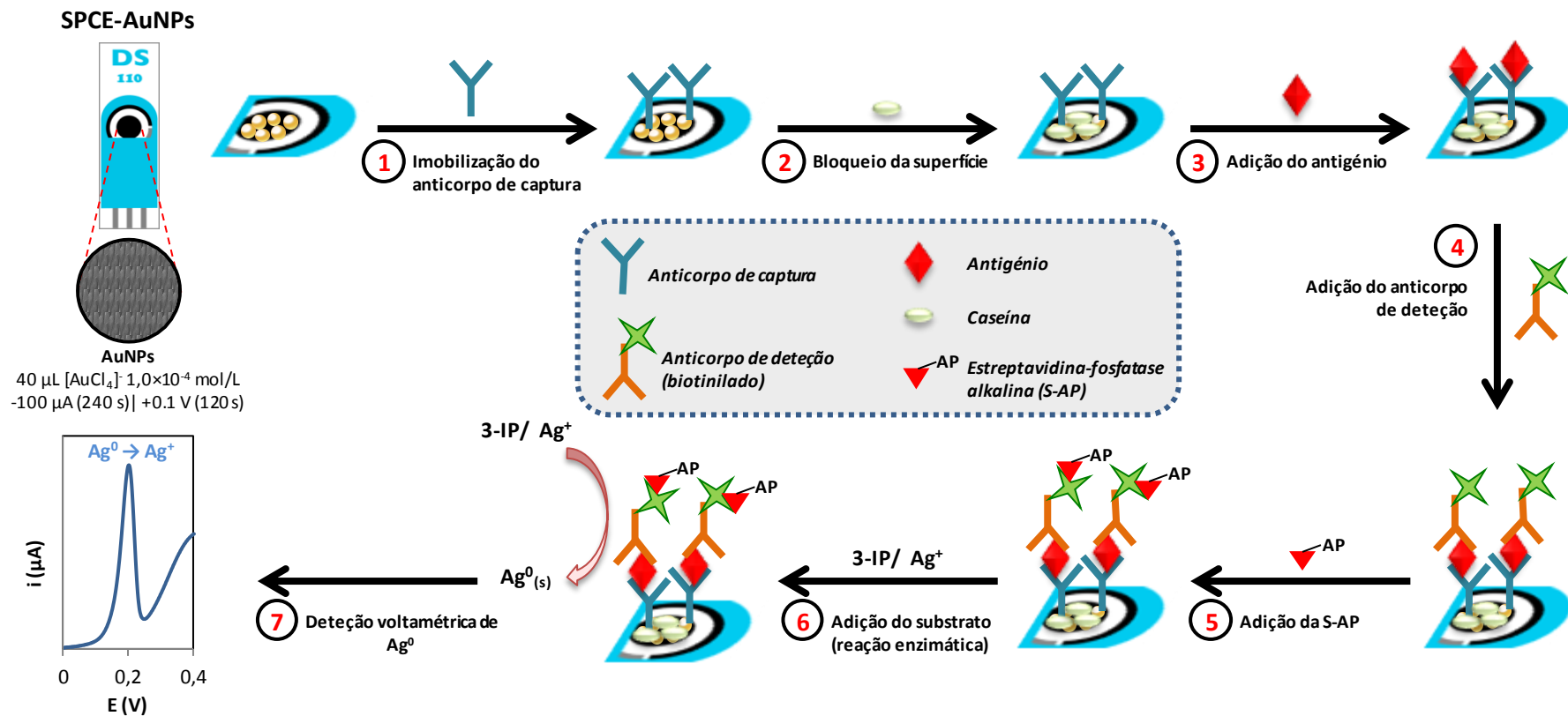


Figura 2.5 - Formato do imunoensaio “normal”

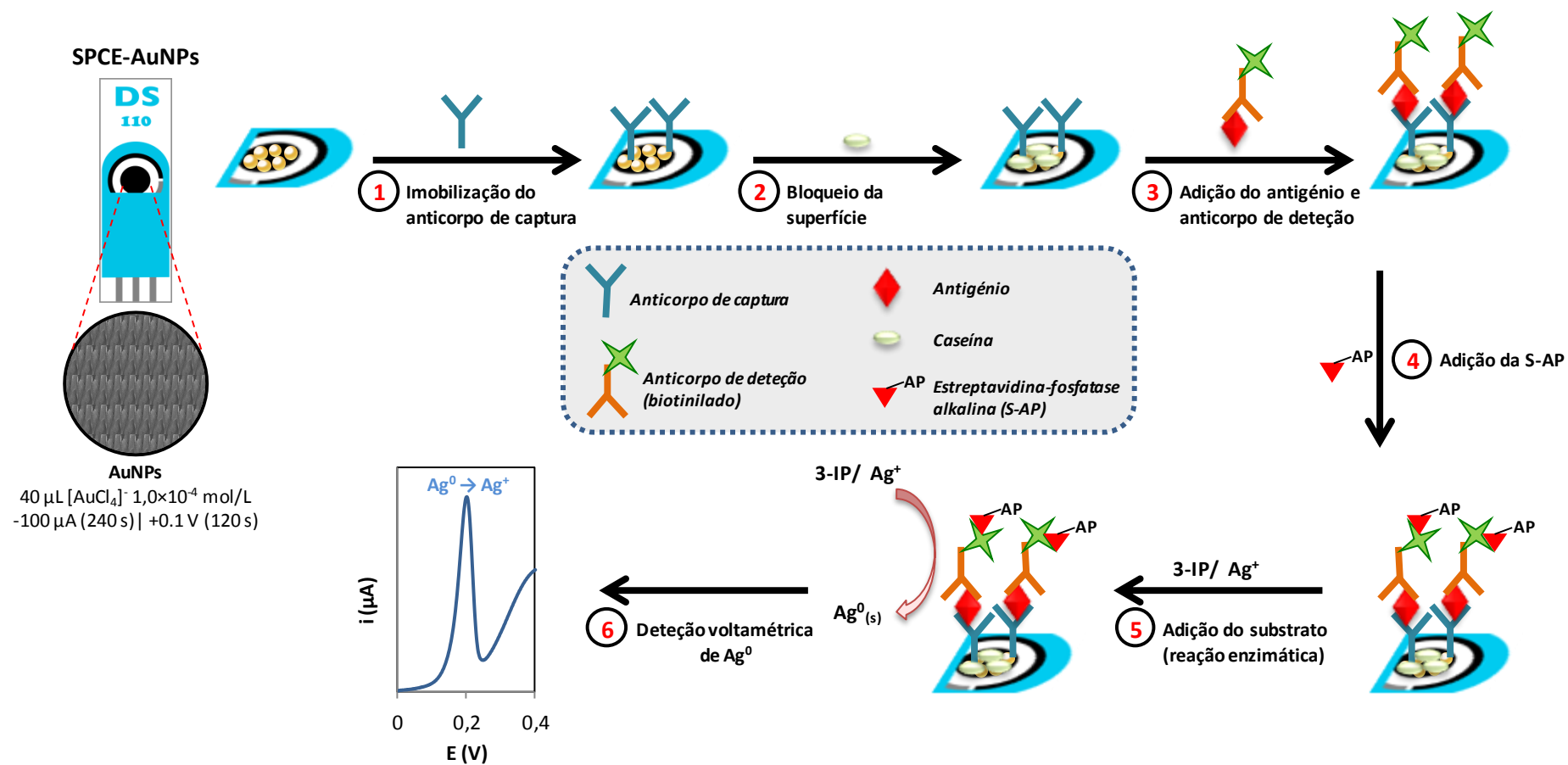


Figura 2.6 - Formato do imunoensaio otimizado

2.3.2.1. Construção da Fase Biossensora

Depois da nanoestruturação dos SPCEs, foram colocados 10 μL de uma solução de anticorpo de captura (anti-HER2 (50 $\mu\text{g/mL}$) ou anti-CA15-3 (100 $\mu\text{g/mL}$)) na superfície do WE (Figura 2.6 (1)), e os elétrodos foram guardados a 4 $^{\circ}\text{C}$, e protegidos da luz, durante a noite. De seguida, lavaram-se os elétrodos com a solução tampão 1 e colocaram-se 40 μL de uma solução de caseína 2% na sua superfície para evitar adsorções não específicas (Figura 2.6 (2)). Após 30 min os elétrodos foram lavados com a solução tampão 1.

2.3.2.2. Análise de HER2 e CA 15-3

A detecção do biomarcador HER2 foi realizada em tampão (solução aquosa) e em soro. No imunoensaio otimizado para a detecção do biomarcador HER2 em tampão, colocaram-se 40 μL de uma mistura feita com a concentração pretendida de antigénio (0, 15, 25, 50, 75, 100 ou 150 ng/mL) e concentrações fixas do anticorpo de detecção (1 $\mu\text{g/mL}$) e de albumina (0,5%), na superfície do eléctrodo (Figura 2.6 (3)). Após uma incubação de 1 h lavaram-se os elétrodos com a solução tampão 1. De seguida colocaram-se 40 μL de uma solução de S-AP 2×10^{-10} mol/L no eléctrodo (Figura 2.6 (4)) e, após 1 h, lavou-se com a solução tampão 2. Por fim, 40 μL de uma solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L) foram colocados no eléctrodo (Figura 2.6 (5)) e após 20 min o sinal analítico foi registado, recorrendo a voltametria de varrimento linear (Figura 2.6 (6)) (ver sub-capítulo 2.3.2.3.).

No imunoensaio otimizado para a detecção do biomarcador HER2 em soro, colocaram-se 40 μL de uma mistura feita com 250 μL de soro, a concentração pretendida de antigénio (0, 15, 25, 50, 75, 100 ou 150 ng/mL) e a concentração fixa do anticorpo de detecção (1 $\mu\text{g/mL}$), na superfície do eléctrodo. Após uma incubação de 1 h lavaram-se os elétrodos com a solução tampão 1. As etapas seguintes foram iguais às descritas para a detecção do HER2 em tampão.

No imunoensaio otimizado para a detecção do biomarcador CA 15-3 colocaram-se, na superfície do eletrodo, 20 μL de uma solução do antígeno com a concentração pretendida (0, 15, 50, 125 e 250 U/mL) e 20 μL da solução do anticorpo de detecção (2 $\mu\text{g/mL}$). Após uma incubação de 1 h lavaram-se os eletrodos com a solução tampão 1. De seguida colocaram-se 40 μL de uma solução de S-AP 2×10^{-10} mol/L no eletrodo e, após 1 h, lavou-se com a solução tampão 2. Por fim, 40 μL de uma solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L) foram colocados no eletrodo e após 20 min o sinal analítico foi registado, recorrendo a voltametria de varrimento linear (ver sub-capítulo 2.3.2.3.).

2.3.2.3. Registo do Sinal Analítico

O método utilizado para a detecção do sinal analítico foi desenvolvido por Fanjul-Bolado et al.[74]. Neste método uma mistura de 3-IP e Ag^+ é utilizada como substrato da AP. A AP hidrolisa o 3-IP dando origem a um produto intermédio, que oxida a azul de indigo. Neste processo, a prata em solução é reduzida a prata metálica que é depositada no sítio onde a AP está ligada. A prata assim depositada é redissolvida eletroquimicamente e a intensidade de corrente resultante é medida.

No presente trabalho utiliza-se a voltametria de varrimento linear (-0,03 V a +0.4 V, velocidade de varrimento: 50 mV/s) para a redissolução da prata e para a medição da intensidade de corrente. O mecanismo deste método é ilustrado na Figura 2.7[75].

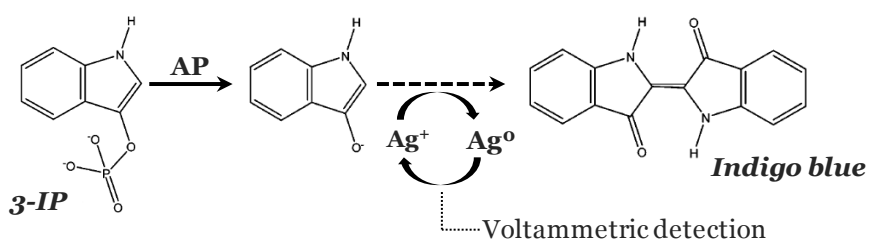


Figura 2.7 - Mecanismo da deposição catalisada de prata por AP para a detecção voltamétrica[75]

Resultados e Discussão

Ao longo da realização do trabalho, o método utilizado para a detecção da interação entre o antígeno e o anticorpo foi baseado na redissolução voltamétrica da prata depositada na etapa da reação enzimática (ver sub-capítulo 2.3.2.3). A intensidade de corrente do pico (i_p) resultante é a medida analítica para avaliar esta interação. O potencial de oxidação (E_p) da prata é entre, nas condições utilizadas, cerca de +0,15 e +0,20 V. Um exemplo de um voltamograma obtido é indicado na Figura 3.1.

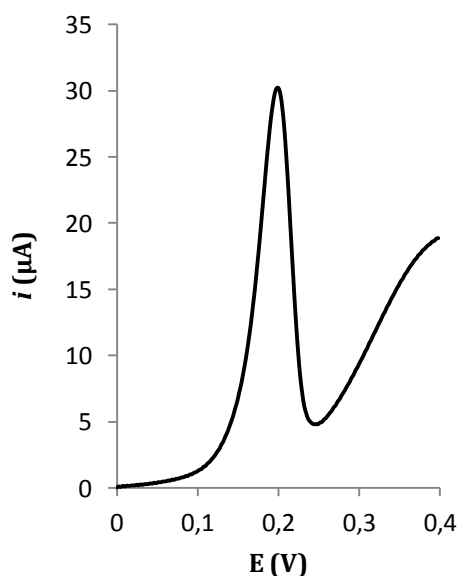


Figura 3.1 - Exemplo de um voltamograma de varrimento linear obtido no presente trabalho

3.1. Imunossensor para a Detecção do Biomarcador HER2

3.1.1. Modificação da Superfície do Transdutor com Nanopartículas de Ouro

A modificação da superfície do transdutor é um passo importante no desenvolvimento do sensor. Com o objetivo de aumentar a sua biocompatibilidade e a sensibilidade, a superfície do transdutor foi modificada com AuNPs.

Foram estudados dois métodos de modificação utilizando (1) uma solução de $[\text{AuCl}_4]^-$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L e uma intensidade de corrente de $-5 \mu\text{A}$, aplicada durante 60 s, e (2) uma solução de $[\text{AuCl}_4]^-$ $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L e uma intensidade de corrente de $-100 \mu\text{A}$, aplicada durante 240 s. Para avaliar estes SPCEs nanoestruturados, foram realizados ensaios utilizando os seguintes reagentes: Ab de captura ($50 \mu\text{g/mL}$), caseína (2%), HER2 (0 (branco) e 300 ng/mL), Ab de detecção (1, 5 e $10 \mu\text{g/mL}$), S-AP (1×10^{-10} mol/L) e uma solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L). As intensidades de corrente (i_p) ($n = 3$) obtidas são apresentadas na Figura 3.2.

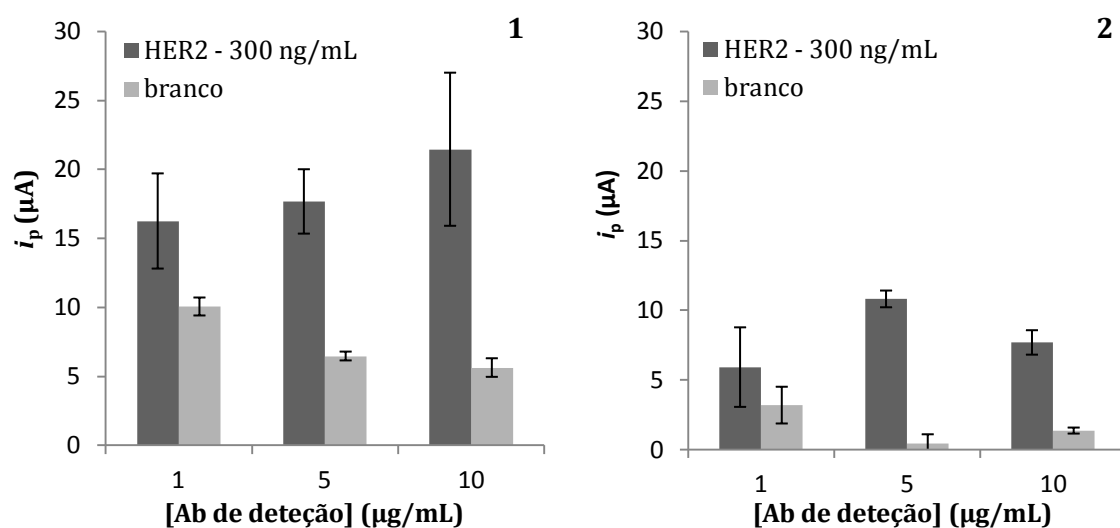


Figura 3.2 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes concentrações de anticorpo de detecção (1, 5 e $10 \mu\text{g/mL}$) e SPCEs modificados com AuNPs produzidas com $[\text{AuCl}_4]^-$

(1) $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L (i : $-5 \mu\text{A}$; t : 60 s) e (2) $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L (i : $-100 \mu\text{A}$; t : 240 s).

(Ab captura ($50 \mu\text{g/mL}$), caseína (2%), HER2 (0 (branco) e 300 ng/mL), S-AP (1×10^{-10} mol/L), 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L))

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que a nanoestruturação (1) ($[\text{AuCl}_4]^-$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L; i : $-5 \mu\text{A}$; t : 60 s) resultou em valores de i_p mais elevados para todas as concentrações do anticorpo de detecção. No entanto, os valores de i_p para os ensaios em branco foram também elevados, o que aumentará significativamente o limite de detecção. Assim, é preferível utilizar a nanoestruturação (2) ($[\text{AuCl}_4]^-$ $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L; i : $-100 \mu\text{A}$; t : 240 s) para poder analisar concentrações baixas do analito. Em relação ao anticorpo de detecção, e com a utilização da nanoestruturação (2), a maior diferença entre o sinal, na presença do analito, e o branco foi obtida com a concentração de $5 \mu\text{g/mL}$. Por isso, esta foi a concentração utilizada nos ensaios seguintes.

3.1.2. Otimização da Fase Biossensora e do Imunoensaio

3.1.2.1. Otimização da Concentração de S-AP

Para a otimização da concentração de S-AP foram estudadas quatro concentrações: 1×10^{-10} ; 2×10^{-10} ; 5×10^{-10} e 1×10^{-9} mol/L. As concentrações dos outros reagentes utilizados para a realização do ensaio foram: Ab de captura (50 $\mu\text{g/mL}$), caseína (2%), HER2 (0 (branco) e 300 ng/mL), Ab de detecção (5 $\mu\text{g/mL}$) e uma solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L). As intensidades de corrente (i_p ; $n = 3$) obtidas são apresentadas na Figura 3.3.

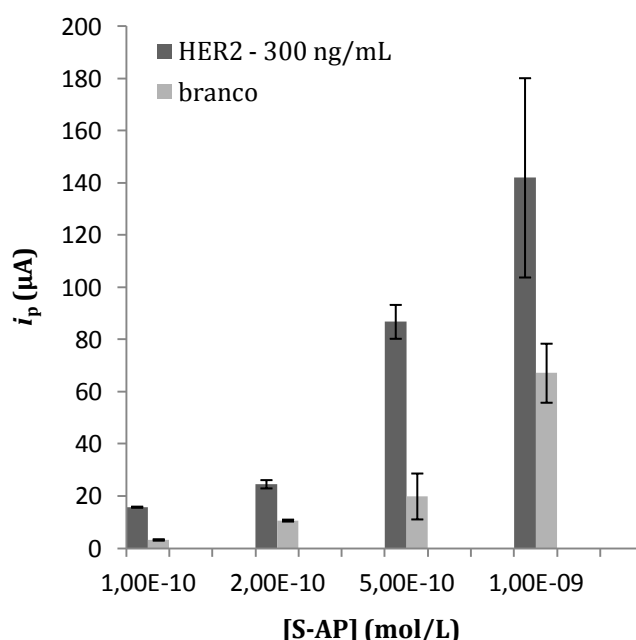


Figura 3.3 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes concentrações de S-AP (1×10^{-10} ; 2×10^{-10} ; 5×10^{-10} e 1×10^{-9} mol/L).

(Ab captura (50 $\mu\text{g/mL}$), caseína (2%), HER2 (0 (branco) e 300 ng/mL), Ab de detecção (5 $\mu\text{g/mL}$), 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L))

Conforme se pode observar na Figura 3.3, a i_p aumenta com o aumento da concentração de S-AP, tanto para os ensaios com o HER2 como para os ensaios em branco. Também se pode concluir que a precisão dos resultados diminui com o aumento da concentração da S-AP. Assim, a concentração de S-AP de 2×10^{-10} mol/L foi escolhida para ser utilizada nos ensaios seguintes.

3.1.2.2. Otimização das Etapas do Imunoensaio

Conforme foi referido na secção 2.3.2, com o objetivo de diminuir o tempo do ensaio, foram combinadas várias etapas, e testadas várias alternativas de pré-incubação dos reagentes antes da sua colocação no SPCE. As misturas estudadas foram as seguintes: (1) HER2 com anticorpo de deteção; (2) anticorpo de deteção com S-AP; e (3) HER2 com anticorpo de deteção e S-AP. As concentrações dos reagentes utilizados para a realização dos ensaios foram: Ab de captura (50 $\mu\text{g/mL}$), caseína (2%), HER2 (0 (branco) e 300 ng/mL), Ab de deteção (5 $\mu\text{g/mL}$), S-AP (2×10^{-10} mol/L) e uma solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L). Além disso, foi adicionada às misturas uma solução de BSA (concentração final: 0,5%) para tentar reduzir as intensidades de corrente dos ensaios em branco, uma vez que nos ensaios anteriores, estes apresentaram valores relativamente elevados, o que dificulta a deteção de concentrações baixas de HER2.

Para as alternativas (2) e (3) não foram observados os picos correspondentes à oxidação da prata ($i_p = 0$). Neste sentido, concluiu-se que a inclusão de S-AP nas misturas não é adequada e que esta terá de ser incluída numa etapa separada. Os resultados obtidos com a abordagem alternativa (1) e com o método dito 'normal' estão apresentados na Figura 3.4.

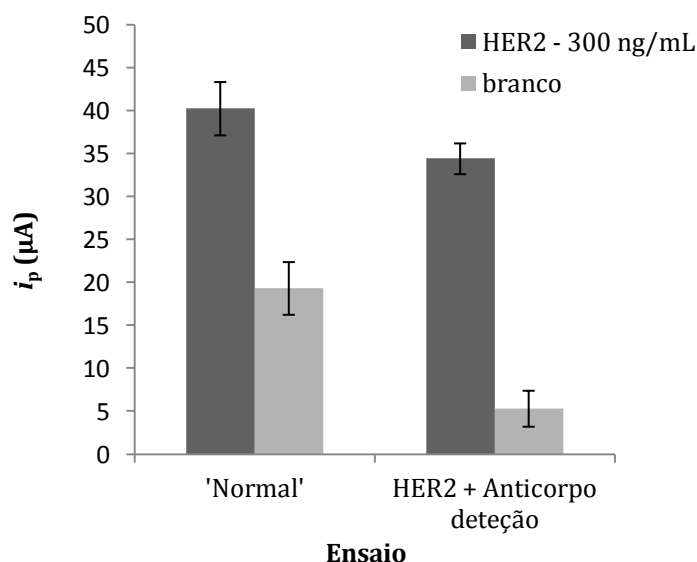


Figura 3.4 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes estratégias de ensaio.

(Ab captura (50 $\mu\text{g/mL}$), caseína (2%), HER2 (0 (branco) e 300 ng/mL), Ab de deteção (5 $\mu\text{g/mL}$), BSA (0,5%), S-AP (2×10^{-10} mol/L), 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L))

Conforme se pode observar na Figura 3.4, a pré-incubação do HER2 com o anticorpo de detecção apresenta uma i_p para o branco mais baixa e uma maior diferença entre os sinais do ensaio com o analito e o branco, quando comparado com o ensaio 'normal'. Assim, a utilização desta mistura pode-se tornar uma mais valia para o desenvolvimento do imunoensaio, uma vez que reduz o tempo de análise em 1 h.

Embora a mistura de HER2 com o anticorpo de detecção tenha apresentado resultados satisfatórios, foi realizado um estudo adicional para avaliar se a mistura deveria ser feita no momento em que é depositada no SPCE ou algum tempo (cerca de 1 h) antes. As condições de realização do ensaio foram as mencionadas em cima. Os resultados são apresentados na Figura 3.5.

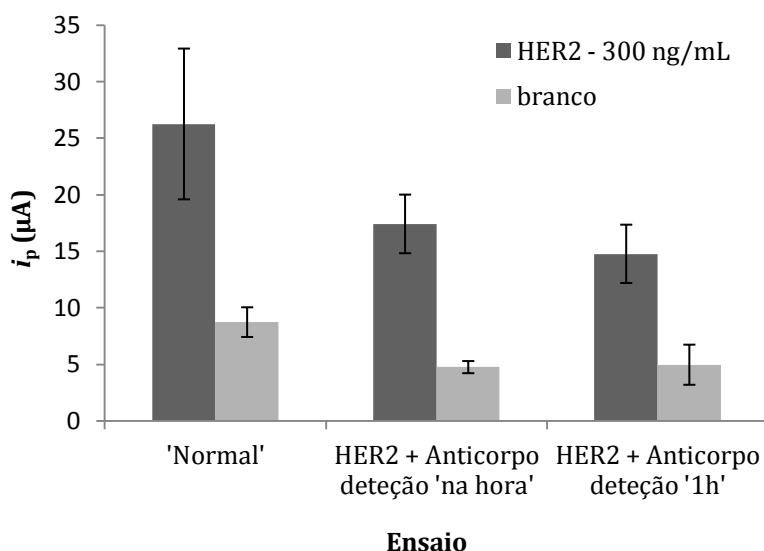


Figura 3.5 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes estratégias de ensaio ('normal' e mistura HER2 com anticorpo de detecção). (Ab captura (50 µg/mL), caseína (2%), HER2 (0 (branco) e 300 ng/mL), Ab de detecção (5 µg/mL), BSA (0,5%), S-AP (2×10^{-10} mol/L), 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L))

Pela análise dos resultados obtidos concluiu-se que a forma mais eficaz de realizar o ensaio é através da mistura feita no momento da sua utilização.

3.1.2.3. Otimização das Concentrações dos Anticorpos de Captura e de Detecção para a Análise de HER2

Com o objetivo de otimizar as concentrações dos anticorpos de captura e de detecção, foram realizados ensaios utilizando as seguintes condições: Ab de captura (10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), caseína (2%), HER2 (0 (branco) e 150 ng/mL), Ab de detecção (0,1; 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$), S-AP (2×10^{-10} mol/L) e uma solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L). Para a realização destes ensaios foi adicionada BSA (concentração final: 0,5%) às misturas de HER2 com o Ab de detecção. Pelos resultados obtidos (Figura 3.6) é possível concluir que, na maioria dos casos, quanto maiores as concentrações dos anticorpos de captura e de detecção, mais elevada é a i_p . Para a combinação do Ab de captura 50 $\mu\text{g/mL}$ com o Ab de detecção 1 $\mu\text{g/mL}$, foi obtida a maior i_p e um sinal do branco aceitável. Por isso, estas concentrações foram as escolhidas para os ensaios seguintes.

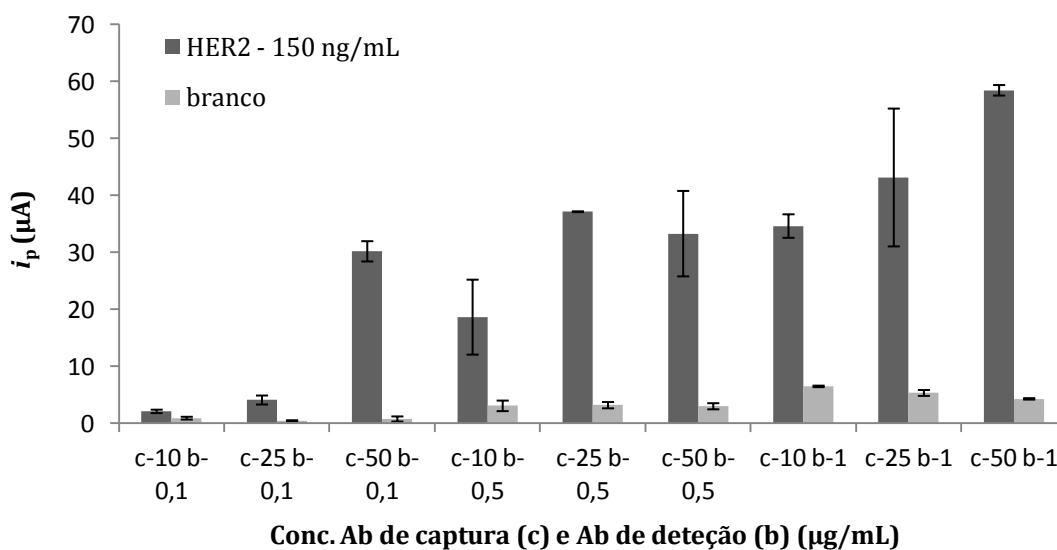


Figura 3.6 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes concentrações de Ab de captura (10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e de Ab de detecção (0,1; 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$). (Caseína (2%), HER2 (0 (branco) e 150 ng/mL), BSA (0,5%), S-AP (2×10^{-10} mol/L), 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L))

3.1.3. Curvas de Calibração

Para estabelecer a curva de calibração para a análise do HER2 foram efetuados ensaios com concentrações diferentes de HER2 (15, 25, 50, 75, 100 e 150 ng/mL) e com as concentrações otimizadas anteriormente, dos outros reagentes, ou seja, Ab de captura (50 µg/mL), caseína (2%), BSA (0,5%), Ab de detecção (1 µg/mL), S-AP (2×10^{-10} mol/L) e a solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L). Estes ensaios foram efetuados tanto em tampão (solução aquosa) como em soro humano.

3.1.3.1. Curva de Calibração - HER2 em tampão

A curva de calibração para a análise de HER2 em tampão foi estabelecida entre 15 e 150 ng/mL (Figura 3.7). Esta curva de calibração serviu para identificar a zona de linearidade entre a i_p e a concentração de HER2 para, de seguida, se estabelecer a curva de calibração para a análise de HER2 em soro humano.

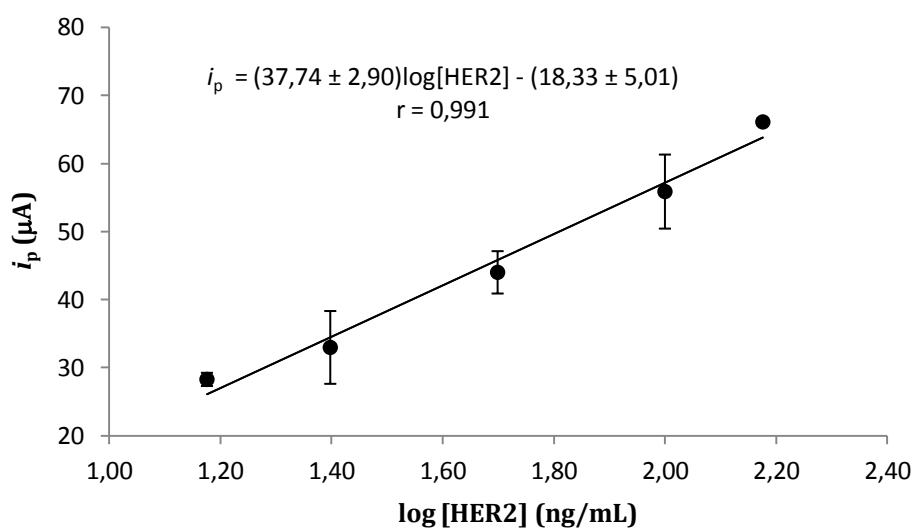


Figura 3.7 - Curva de calibração (i_p vs. $\log[\text{HER2}]$) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de HER2 em tampão

3.1.3.2. Curva de Calibração - HER2 em soro

Uma vez que a finalidade do imunossensor é a quantificação do HER2 em soro humano, também foi construída uma curva de calibração utilizando soro humano como matriz. Na Figura 3.8 estão representados voltamogramas típicos, enquanto que na Figura 3.9 é apresentada a curva de calibração, obtida a partir das intensidades de corrente de pico apresentadas na Tabela 3.1. As condições do ensaio realizado com soro foram as mesmas do ensaio em tampão. No entanto, aquando da realização das misturas HER2 com Ab de deteção, não foi adicionada BSA pois poderia bloquear por completo a superfície do transdutor.

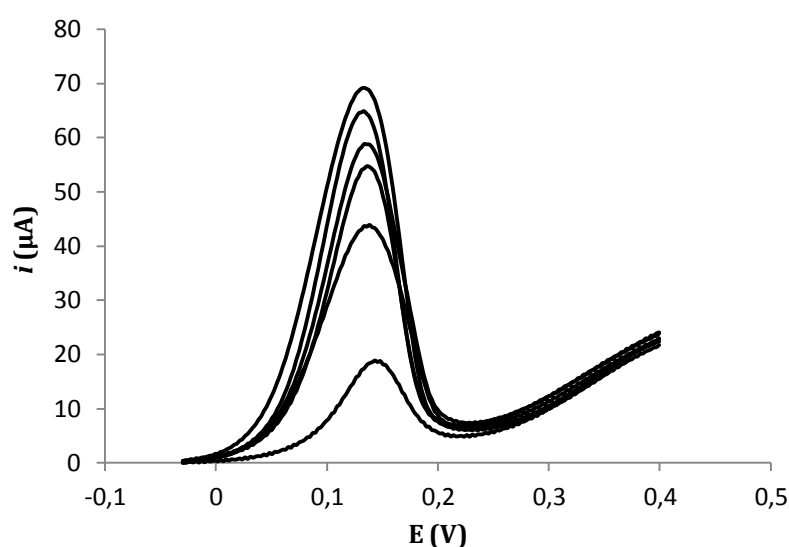


Figura 3.8 - Voltamogramas de varrimento linear (-0,03 V a +0.4 V, velocidade de varrimento: 50 mV/s) de análise de HER2 em soro humano [HER2] (ng/mL): 0, 15, 25, 50, 75 e 100 (aumento da i_p com aumento da concentração).

(Ab de captura (50 $\mu\text{g/mL}$), caseína (2%), Ab de deteção (1 $\mu\text{g/mL}$), S-AP (2×10^{-10} mol/L), 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L))

Analisando os voltamogramas da Figura 3.8 verifica-se um aumento claro da i_p com o aumento da concentração do HER2 e, para além disso, é possível verificar a diferença significativa entre o branco (0 ng/mL) e o padrão de concentração mais baixa (15 ng/mL).

Tabela 3.1 - Intensidades de corrente de pico (i_p) para cada concentração de HER2 da curva de calibração

[HER2] (ng/mL)	$i_p(\mu A)^*$
15	$38,9 \pm 0,9$
25	$46,5 \pm 4,3$
50	$56,0 \pm 4,2$
75	$60,7 \pm 2,4$
100	$67,8 \pm 3,7$

* média \pm desvio padrão (n = 3)

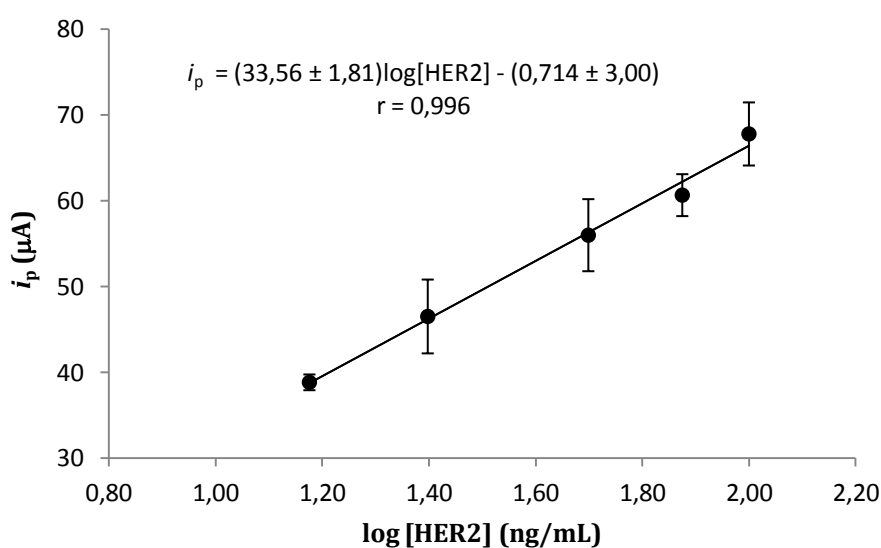


Figura 3.9 - Curva de calibração (i_p vs. $\log[HER2]$) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de HER2 em soro humano

Com base na comparação do declive da curva de calibração feita em soro e o declive da curva de calibração feita em tampão, é possível concluir que a influência da matriz do soro é reduzida, uma vez que a razão dos valores dos declives é de 0,89.

Na Tabela 3.2 são indicadas as características da curva de calibração [76, 77] e o limite de detecção (LOD) para a análise de HER2 em soro humano. O LOD foi calculado com base na média (n = 3) da i_p e o respetivo desvio padrão (S_b) dos ensaios em branco de acordo com a Equação 1:

$$LOD = 10^{\frac{(i_p + 3 \times S_b) - a}{m}} \quad \text{Equação 1}$$

Tabela 3.2 - Características da curva de calibração e limite de detecção para a análise de HER2 em soro humano

Característica	
Intervalo de concentração (ng/mL)	15 - 100
Coefficiente de correlação (r)	0,996
Declive (m)	33,56
Desvio padrão do declive (S_m)	1,81
Interceção (a)	-0,714
Desvio padrão da interceção (S_a)	3,00
Desvio padrão da regressão linear ($S_{y/x}$)	1,23
Desvio padrão do método (S_{x0})	0,037
Coefficiente de variação do método (V_{x0}) (%)	2,2
Limite de detecção (LOD) (ng/mL)	4,4

Das características apresentadas na Tabela 3.2, é possível concluir que o intervalo de concentração e o limite de detecção são adequados para a análise de HER2 no soro humano uma vez que o valor limite (*cutoff value*) estabelecido é de 15 ng/mL. Também se pode concluir que o método é preciso ($V_{x0} < 5\%$).

Desta forma é possível concluir que o imunossensor desenvolvido poderá ter aplicação no diagnóstico precoce e descentralizado do cancro da mama.

3.2. Imunossensor para a Detecção do Biomarcador CA 15-3

3.2.1. Otimização da Fase Biossensora e do Imunoensaio

No desenvolvimento do imunossensor para a detecção do biomarcador CA 15-3, tendo em conta que alguns parâmetros do ensaio são iguais aos do ensaio para detecção do HER2, foram adotadas as mesmas condições, nomeadamente, a nanoestruturação dos elétrodos, o bloqueio da superfície com caseína 2%, a concentração da S-AP 2×10^{-10} mol/L e o substrato enzimático (1×10^{-3} mol/L de 3-IP com 4×10^{-4} mol/L de AgNO_3).

Contudo, foi necessário otimizar as concentrações do Ab de captura e do Ab de detecção. Os padrões do CA 15-3 utilizados foram os que estavam incluídos no "CanAg CA15-3 EIA kit" com concentrações de 0, 15, 50, 125 e 250 U/mL.

Tal como no ensaio do HER2, foi feita uma mistura prévia do antigénio (CA 15-3) e do Ab de detecção. No entanto, em vez da mistura ser feita à parte (num tubo Eppendorf), esta foi realizada diretamente no SPCE, juntando 10 µL de um dos padrões de CA 15-3 e 20 µL de Ab de detecção.

3.2.1.1. Otimização das Concentrações dos Anticorpos de Captura e de Detecção para a Análise de CA 15-3

Para a otimização das concentrações do Ab de captura e do Ab de detecção foram realizados ensaios utilizando as seguintes condições: Ab de captura (1, 10 e 50 µg/mL), caseína (2%), misturas das concentrações mínima e máxima de CA 15-3 (0 e 250 U/mL) com diferentes concentrações de Ab de detecção (1,5 e 2,5 µg/mL), S-AP (2×10^{-10} mol/L) e uma solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L). Os resultados obtidos nesta otimização estão apresentados na Figura 3.10.

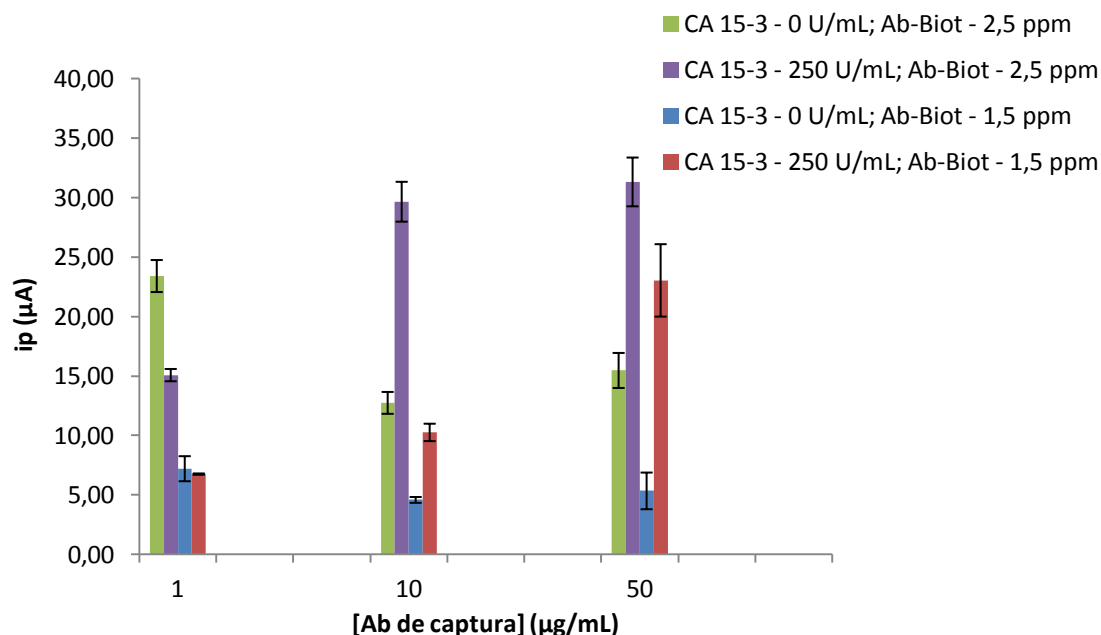


Figura 3.10 - Valores de i_p ($n = 3$) obtidos por voltametria de varrimento linear para diferentes concentrações de Ab de captura (1, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e de Ab de detecção (1,5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$). (Caseína (2%), CA 15-3 (0 (branco) e 250 U/mL), S-AP (2×10^{-10} mol/L), 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L))

Pelos resultados obtidos é possível concluir que com 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de Ab de captura se obtiveram as maiores diferenças entre sinal, na presença de analito, e branco. A concentração de Ab de captura que ficou definida, com base nestes resultados, foi de 50 $\mu\text{g/mL}$ para os ensaios seguintes. Relativamente à concentração de Ab de detecção, a escolhida foi a de 1,5 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Curvas de Calibração

Para estabelecer a curva de calibração para a análise do CA 15-3, foram efetuados ensaios com diferentes concentrações de CA 15-3 (0, 15, 50, 125 e 250 U/mL) e com as concentrações otimizadas anteriormente, dos outros reagentes, ou seja, Ab de captura (50 $\mu\text{g/mL}$), caseína (2%), Ab de detecção (1,5 $\mu\text{g/mL}$), S-AP (2×10^{-10} mol/L) e a solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L). Estes ensaios foram efetuados apenas em tampão (solução aquosa).

A primeira curva de calibração obtida está representada na Figura 3.11 e, conforme se pode observar, os resultados não foram os esperados, tendo-se verificado uma perda de sinal significativa comparativamente com os valores observados na Figura 3.10, para as mesmas condições.

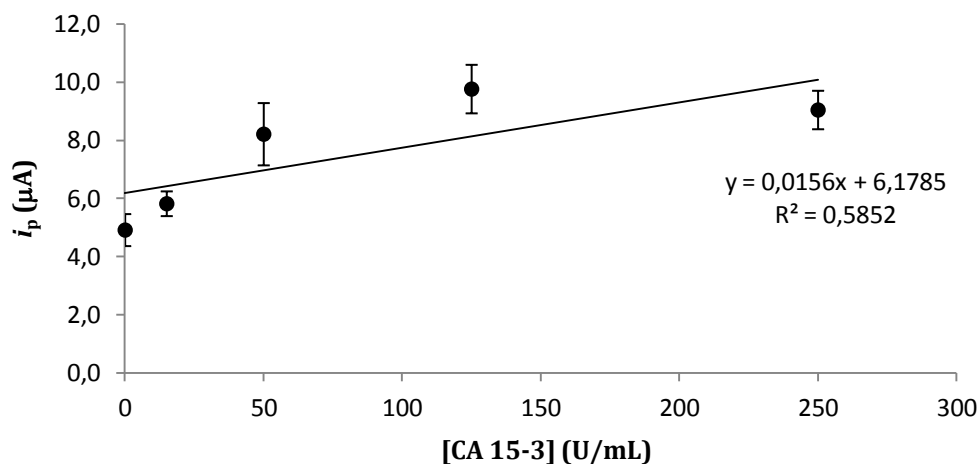


Figura 3.11 - Curva de calibração (i_p vs. [CA 15-3]) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de CA 15-3 em tampão

Tendo em conta que se verificou uma perda de sinal não esperada, o ensaio foi repetido nas mesmas condições do anterior, tendo sido alterada apenas a concentração de Ab de captura para 100 $\mu g/mL$. Os resultados estão representados na Figura 3.12.

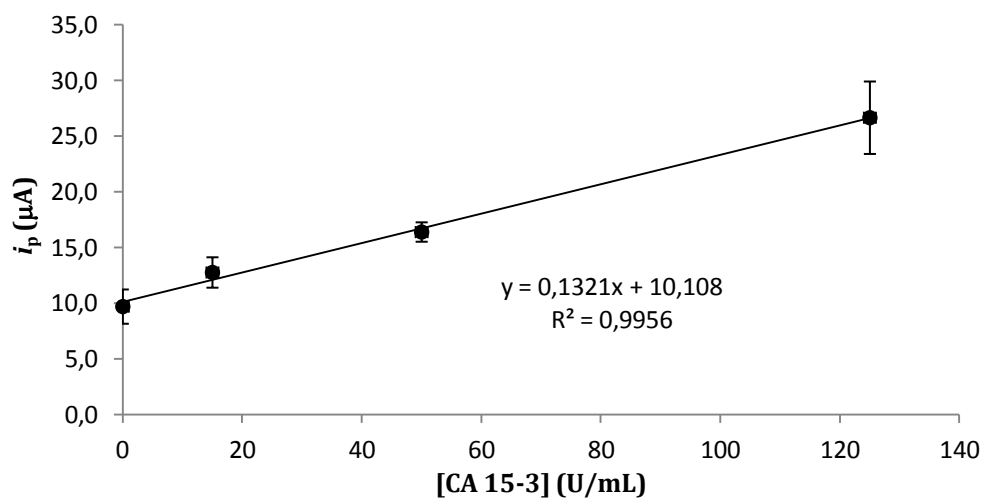


Figura 3.12 - Curva de calibração (i_p vs. [CA 15-3]) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de CA 15-3 em tampão

Com este ensaio já foi possível obter valores de sinal adequados. No entanto, a diferença entre 0 U/mL e 15 U/mL não é muito elevada. Com o objetivo de aumentar essa diferença, foi realizado um ensaio no qual foi aumentado o volume de CA 15-3 na mistura para 20 μL e a concentração de Ab de deteção para 2 $\mu g/mL$.

Assim, a curva de calibração estabelecida para a análise do CA 15-3, foi obtida através da realização de um ensaio com as seguintes condições: Ab de captura (100 µg/mL), caseína (2%), mistura, no eléctrodo, de 20 µL de diferentes concentrações de CA 15-3 (0, 15, 50, 125 e 250 U/mL) e 20 µL de uma concentração fixa de Ab de detecção (2 µg/mL), S-AP (2×10^{-10} mol/L) e uma solução contendo 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L).

Na Figura 3.13 estão representados os voltamogramas típicos obtidos com este ensaio e na Figura 3.14 é apresentada a curva de calibração estabelecida do imunossensor. As intensidades de corrente de pico, a partir das quais foi obtida a curva de calibração, estão apresentadas na Tabela 3.3.

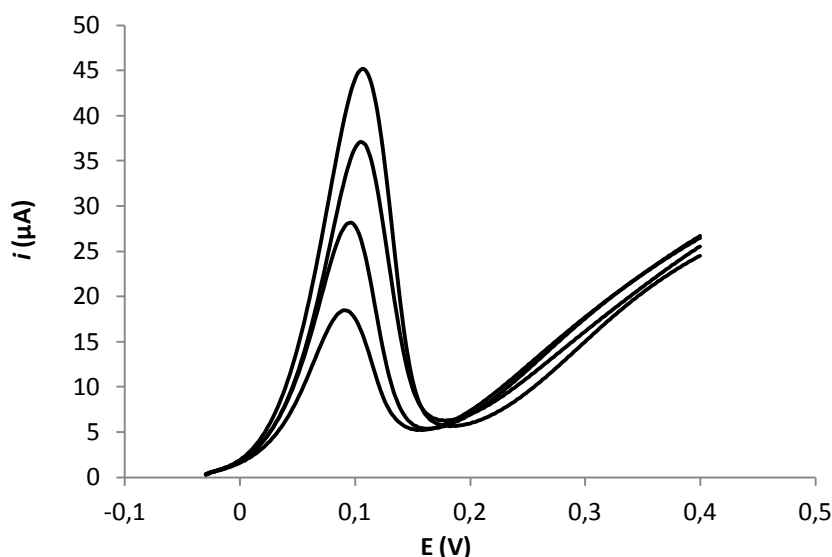


Figura 3.13 - Voltamogramas de varrimento linear (-0,03 V a +0.4 V, velocidade de varrimento: 50 mV/s) de análise de CA 15-3 em tampão [CA 15-3] (U/mL): 15, 50, 125 e 250 (aumento da i_p com aumento da concentração).

(Ab de captura (100 µg/mL), caseína (2%), Ab de detecção (2 µg/mL), S-AP (2×10^{-10} mol/L), 3-IP ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e Ag^+ ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L))

A análise dos voltamogramas da Figura 3.13 permite comprovar um aumento claro da i_p com o aumento da concentração do CA 15-3, verificando-se uma diferença notória entre 15 e 50 U/mL.

Tabela 3.3 - Intensidades de corrente de pico (i_p) para cada concentração de CA 15-3 da curva de calibração

[CA 15-3] (U/mL)	$i_p(\mu A)^*$
15	$13,0 \pm 1,8$
50	$24,9 \pm 1,4$
125	$34,4 \pm 1,9$
250	$38,3 \pm 2,9$

* média \pm desvio padrão (n = 3)

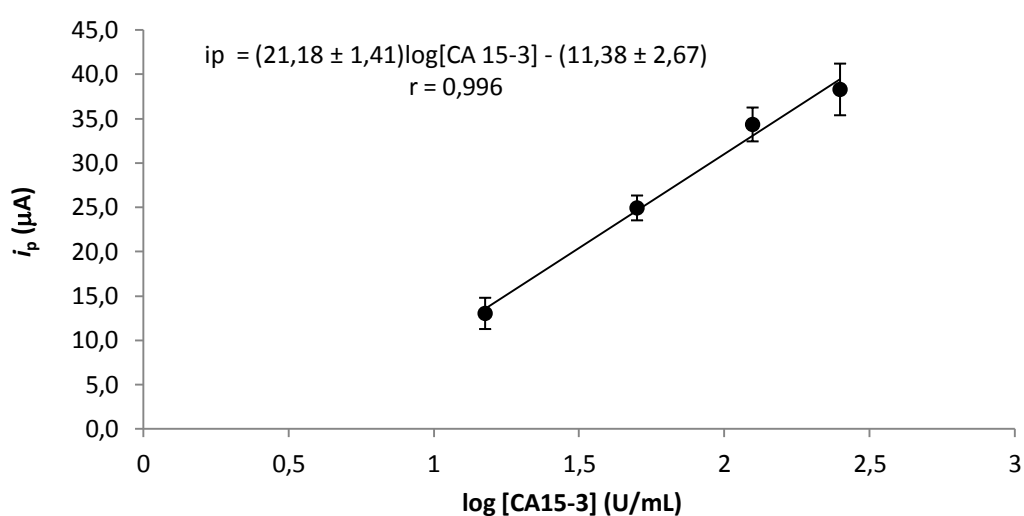


Figura 3.14 - Curva de calibração (i_p vs. $\log[CA\ 15-3]$) obtida com o imunossensor desenvolvido para a análise de CA 15-3 em tampão

Na Tabela 3.4 são indicadas as características da curva de calibração [76, 77] e o limite de detecção (calculado com base na Equação 1) para a análise de CA 15-3 em solução aquosa.

Tabela 3.4 - Características da curva de calibração e limite de detecção para a análise de CA 15-3 em solução aquosa

Característica	
Intervalo de concentração (U/mL)	15 - 250
Coeficiente de correlação (r)	0,996
Declive (m)	21,18
Desvio padrão do declive (S_m)	1,41
Interceção (a)	-11,38
Desvio padrão da interceção (S_a)	2,67
Desvio padrão da regressão linear ($S_{y/x}$)	1,29
Desvio padrão do método (S_{x0})	0,061
Coeficiente de variação do método (V_{x0}) (%)	3,3
Limite de detecção (LOD) (U/mL)	37,5

Conforme se pode observar na Tabela 3.4, o LOD foi mais elevado do que o valor limite estabelecido de CA 15-3 (30 U/mL) para o diagnóstico do cancro da mama, o que se deve aos valores de i_p relativamente elevados dos ensaios em branco.

Tendo em conta que o desenvolvimento deste imunossensor ainda não está finalizado, uma vez que ainda não foi testada a análise do biomarcador em soro humano, deverão ser realizados estudos com o objetivo de diminuir os sinais dos ensaios em branco e, conseqüentemente, o limite de detecção. Neste sentido, algumas das alterações que possam ter de ser introduzidas passam, por exemplo, por um melhor bloqueio da superfície. Além disso, aquando da realização da análise em soro, é possível que o bloqueio seja mais eficaz devido aos constituintes do soro.

Embora os resultados para este imunossensor não tenham sido os pretendidos, ele continua a parecer promissor para o diagnóstico do cancro da mama.

Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho foram desenvolvidos dois imunossensores eletroquímicos para a análise de dois biomarcadores do cancro da mama, HER2 e CA 15-3. O transdutor, para ambos os imunossensores, foi um eléctrodo de carbono serigrafado (SPCE) cuja superfície foi modificada com nanopartículas de ouro. Estas nanopartículas foram depositadas na superfície do SPCE através da eletrodeposição de ouro de uma solução de $[\text{AuCl}_4]^-$ $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L utilizando uma intensidade de corrente de $-100 \mu\text{A}$, aplicada durante 240 s.

Para a construção da fase biossensora dos imunossensores foram imobilizados anticorpos monoclonais anti-HER2 (50 $\mu\text{g/mL}$) ou anti-CA 15-3 (100 $\mu\text{g/mL}$) humano na superfície nanoestruturada do SPCE. De seguida a superfície foi bloqueada com caseína (2%) para evitar adsorções não-específicas.

O formato do imunoensaio utilizado foi não competitivo (do tipo *sandwich*) e consistiu nas seguintes etapas otimizadas (entre as etapas, o SPCE foi lavado com uma solução tampão adequada): (i) incubação (1 h) com uma mistura do analito (HER2 ou CA 15-3) e um anticorpo monoclonal anti-HER2 ou anti CA 15-3 humano biotinilado (HER2 (1 $\mu\text{g/mL}$); CA 15-3 (2 $\mu\text{g/mL}$)); (ii) incubação (1 h) com estreptavidina ligada a fosfatase alcalina (2×10^{-10} mol/L); (iii) adição de uma mistura do substrato enzimático (3-indoxil fosfato $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e nitrato de prata ($4,0 \times 10^{-4}$ mol/L) e subsequente reação durante 20 min; (iv) deteção, por voltametria de varrimento linear, da prata depositada na etapa (iii).

Com as condições dos imunoensaios otimizadas, e tendo sido verificado um aumento da intensidade de corrente com a concentração dos analitos, foram obtidas as curvas de calibração para cada imunossensor. A deteção do HER2 foi testada em tampão, tendo servido para avaliar a zona de linearidade entre a intensidade de corrente do pico e a concentração de HER2. Ao ser testada em soro, foi verificada uma diminuição, não muito significativa, do declive da curva de calibração o que permite concluir que a influência da matriz do soro é reduzida.

O intervalo das concentrações de HER2, da curva de calibração em soro, foi de 15 a 100 ng/mL e o limite de detecção foi de 4,4 ng/mL. Tendo em conta que o valor limite (*cutoff value*) do HER2 para a confirmação do cancro da mama é de 15 ng/mL, pode-se concluir que o imunossensor desenvolvido poderá ser adequado para a análise deste biomarcador e pode-se comprovar a sua possível utilidade para o diagnóstico precoce e descentralizado do cancro da mama.

Relativamente à detecção do CA 15-3, esta apenas foi realizada em soluções tampão, tendo-se estabelecido a curva de calibração entre 15 e 250 U/mL. O limite de detecção foi mais elevado (37,5 U/mL) do que o valor limite estabelecido (30 U/mL). Para a diminuição do limite de detecção são necessários ensaios adicionais de modo a baixar os sinais dos ensaios em branco. Posteriormente, a análise do biomarcador em amostras de soro deverá ser efetuada para se poder avaliar a utilidade do imunossensor em análises de amostras reais.

Apesar dos resultados obtidos neste trabalho indicarem que os imunossensores desenvolvidos poderão ser ferramentas úteis no diagnóstico do cancro da mama e no acompanhamento de pacientes, estudos subsequentes deverão ser realizados para validar a sua utilização. Nestes estudos, deverão ser analisadas amostras reais de soro, tanto de pacientes como de pessoas saudáveis, sendo os respetivos resultados comparados com os que se obtêm através da realização de procedimentos já estabelecidos para a análise dos biomarcadores, como o ELISA. Aproveitando a versatilidade dos imunossensores eletroquímicos, também é motivo de exploração futura a análise simultânea de HER2 e CA 15-3 através da utilização de um SPCE com 2 elétrodos de trabalho, o que poderá aumentar consideravelmente a exatidão do diagnóstico do cancro da mama.

Bibliografia

1. Seeley R, Stephens T, Tate P. Anatomia e Fisiologia. 6ª ed. Loures: Lusociência; 2005.
2. National Cancer Institute. What is Cancer? [Online: <http://www.cancer.gov/>]. [2013 Fevereiro; Acedido em 2013 Agosto 6].
3. World Health Organization. Fact Sheet on Cancer. [Online: <http://www.who.int/>]. [2013 Janeiro; Acedido em 2013 Julho 27].
4. World Health Organization. 10 Facts on Cancer. [Online: <http://www.who.int/>]. [2013 Janeiro; Acedido em 2013 Julho 27].
5. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008. [Online: <http://globocan.iarc.fr/>]. [2010 ; Acedido em 2013 Agosto 13].
6. Liga Portuguesa Contra o Cancro. Cancro da Mama. [Online: <http://www.ligacontracancro.pt/>]. [2009; Acedido em 2013 Janeiro 8].
7. Tothill I. Biosensors for cancer markers diagnosis. Seminars in Cell & Developmental Biology 2009; 20:55-62.
8. Han KH, Han A, Frazier AB. Microsystems for isolation and electrophysiological analysis of breast cancer cells from blood. Biosensors and Bioelectronics 2006; 21:1907-1914.
9. Cole KD, He HJ, Wang L. Breast cancer biomarker measurements and standards. Proteomics Clinical Applications 2013; 7:17-29.
10. Levenson VV. Biomarkers for early detection of breast cancer: What, when, and where? Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 2007; 1770:847-856.
11. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. Molecular Oncology 2012; 6:140-146.
12. Jesneck JL, Mukherjee S, Yurkovetsky Z, Clyde M, Marks JR, Lokshin AE, Lo JY. Do serum biomarkers really measure breast cancer? BMC Cancer 2009; 9: 164.
13. Genentech. Gene Expressions: Understanding Biomarkers. [Online: <http://www.gene.com/>]. [2011 ; Acedido em 2013 Junho 15].
14. Uygun ZO, Sezgintürk MK. Biosensors for Cancer Biomarkers. Em Serra PA, editor. Biosensors - Emerging Materials and Applications. Rijeka, Croácia: InTech; 2011, p. 499-544.
15. Gouvêa C. Biosensors for Health Applications. Em Serra PA, editor. Biosensors for Health, Environment and Biosecurity. Rijeka, Croácia: InTech; 2011, p. 71-86.

16. Wang J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* 2006; 21:1887-1892.
17. Moina C, Ybarra G. Fundamentals and Applications of Immunosensors. Em Chiu NHL, editor. *Advances in Immunoassay Technology*. Rijeka, Croácia: InTech; 2012, p. 65-80.
18. Wang J. *Analytical Electrochemistry*. 3ª ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2006.
19. Jianrong C, Yuqing M, Nongyue H, Xiaohua W, Sijiao L. *Nanotechnology and Biosensors*. *Biotechnology Advances* 2004; 22:505-518.
20. Perfézou M, Turner APF, Merkoçi A. Cancer detection using nanoparticle-based sensors. *Chemical Society Reviews* 2012; 41:2606-2622.
21. Geddes D. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. *Journal of Midwifery & Women's Health* 2007; 52:556-563.
22. Rasooly A, Jacobson J. Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosensors and Bioelectronics* 2006; 21:1851-1858.
23. Pierce BA. Tópicos Avançados em Genética: Genética do Desenvolvimento, Imunogenética e Genética do Câncer. Em Genética, um Enfoque Conceitual. 1ª ed. Vila Mariana, São Paulo: Guanabara Koogan; 2004, p. 595-614.
24. American Cancer Society. Breast Cancer Detailed Guide. [Online: <http://www.cancer.org/>]. [2012; Acedido em 2013 Junho 22].
25. American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging References. [Online: <http://cancerstaging.org/>]. [2013 ; Acedido em 2013 Outubro 1].
26. Coordenação Nacional para Doenças Oncológicas. *Recomendações Nacionais para Diagnóstico e Tratamento do Cancro Da Mama*. Portugal; 2009.
27. American Cancer Society. Tumor Markers. [Online: <http://www.cancer.org/>]. [2012; Acedido em 2013 Agosto 10].
28. Soper S, Brown K, Ellington A, Frazier B, Garcia-Manero G, Gau V, Gutman S, Hayes D, Korte B, Landers J, Larson D, Ligler F, Majumdar A, Mascini M, Nolte D, Rosenzweig Z, Wang J, Wilson D. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosensors and Bioelectronics* 2006; 21:1932-1942.
29. Bohunicky B, Mousa S. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnology, Science and Applications* 2011; 4:1-10.
30. Souza JVD. Marcadores mucinosos associados a câncer. *Associação Médica do Rio Grande do Sul* 2002; 46:70-83.
31. Wu J, Fu Z, Yan F, Ju H. Biomedical and clinical applications of immunoassays and

- immunosensors for tumor markers. *Trends in Analytical Chemistry* 2007; 26:679-688.
32. Patani N, Martin LA, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *International Journal of Cancer* 2013; 133:1-13.
 33. Nicolini A, Carpi A, Tarro G. Biomolecular markers of breast cancer. *Frontiers in Bioscience* 2006; 11:1818-1843.
 34. Al-Khafaji QAM, Harris M, Tombelli S, Laschi S, Turner APF, Mascini M, Marrazza G. An Electrochemical Immunoassay for HER2 Detection. *Electroanalysis* 2012; 24:735-742.
 35. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *The Oncologist* 2009; 14:320-368.
 36. Lin CW, Chang CC. Breast Cancer Detection Using Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors. Em Preedy VR, Patel VB, editors. *Biosensors and Cancer*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2012, p. 229-247.
 37. Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW. CA 15-3: Uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411:1869-1874.
 38. Begum M, Karim S, Malik A, Khurshid R, Asif M, Salim A, Nagra SA, Zaheer A, Iqbal Z, Abuzenadah AM, Alqahtani MH, Rasool M. CA 15-3 (Mucin-1) and Physiological Characteristics of Breast Cancer from Lahore, Pakistan. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012; 13:5257-5261.
 39. Zhang X, Peng X, Jin W. Scanning electrochemical microscopy with enzyme immunoassay of the cancer-related antigen CA15-3. *Analytica Chimica Acta* 2006; 558:110-114.
 40. Yang Y, Zhong Z, Liu H, Zhu T, Wu J, Li M, Wang D. Double-Layer Nanogold and Double-Strand DNA-Modified Electrode for Electrochemical Immunoassay of Cancer Antigen 15-3. *Electroanalysis* 2008; 20:2621-2628.
 41. Chang CC, Chiu NF, Lin DS, Chu-Su Y, Liang YH, Lin CW. High-Sensitivity Detection of Carbohydrate Antigen 15-3 Using a Gold/Zinc Oxide Thin Film Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor. *Analytical Chemistry* 2010; 82:1207-1212.
 42. Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* 2012; 30:489-511.
 43. Turner APF. Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews* 2013; 42:3184-3196.
 44. Chambers JP, Arulanandam BP, Matta LL, Weis A, Valdes JJ. Biosensor Recognition Elements. *Current Issues in Molecular Biology* 2008; 10:1-12.

45. Lenz G. Métodos Imunológicos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Biofísica; 2004.
46. Wan Y, Su Y, Zhu X, Liu G, Fan C. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* 2013; 47:1-11.
47. Fraden J. Handbook of Modern Sensors: Physics, Designs, and Applications. 3^a ed. New York: Springer-Verlag, Inc.; 2004.
48. Díaz-González M, Hernández-Santos D, González-García MB, Costa-García A. Development of an immunosensor for the determination of rabbit IgG using streptavidin modified screen-printed carbon electrodes. *Talanta* 2005; 65:565-573.
49. Martínez-Paredes G. Electrodo Serigrafiado de Carbono Nanoestruturado com Oro como Transdutores de Biosensores. [Doutoramento]. Oviedo: Universidade de Oviedo, Departamento de Química Física e Analítica; 2009.
50. Kounaves SP. Chapter 37 - Voltammetric Techniques. Em Settle F, editor. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. New Jersey: Prentice Hall PTR; 1997, p. 709-725.
51. Riley T, Watson A. Polarography and Other Voltammetric Methods. Chichester: John Wiley & Sons, Inc.; 1987.
52. Lin J, Ju H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. *Biosensors and Bioelectronics* 2005; 20:1461-1470.
53. Roco MC. Nanoscale Science and Engineering: Unifying and Transforming Tools. American Institute of Chemical Engineers 2004; 50:890-897.
54. Choi YE, Kwak JW, Park J. Nanotechnology for Early Cancer Detection. *Sensors* 2010; 10:428-455.
55. Chikkaveeraiah BV, Bhirde AA, Morgan NY, Eden HS, Chen X. Electrochemical Immunosensors for Detection of Cancer Protein Biomarkers. *ACS Nano* 2012; 6:6546-6561.
56. D'Orazio P. Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* 2011; 412:1749-1761.
57. Martínez-Paredes G, González-García MB, Costa-García A. In situ electrochemical generation of gold nanostructured screen-printed carbon electrodes. Application to the detection of lead underpotential deposition. *Electrochimica Acta* 2009; 54:4801-4808.
58. Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnology, Science and Applications* 2008; 1:17-32.

59. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* 1951; 11:55-75.
60. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews* 2009; 38:1759-1782.
61. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science* 1973; 241:20-22.
62. Faraday M. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 1857; 147:145-181.
63. Dequaire M, Degrand C, Limoges B. An Electrochemical Metalloimmunoassay Based on a Colloidal Gold Label. *Analytical Chemistry* 2000; 72:5521-5528.
64. Marques P, Yamanaka H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Química Nova* 2008; 31:1791-1799.
65. Jung Y, Jeong JY, Chung BH. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. *Analyst* 2008; 133:697-701.
66. Ge S, Yu F, Ge L, Yan M, Yu J, Chen D. Disposable electrochemical immunosensor for simultaneous assay of a panel of breast cancer tumor markers. *Analyst* 2012; 137:4727-4733.
67. Li H, He J, Li S, Turner APF. Electrochemical immunosensor with N-doped graphene-modified electrode for label-free detection of the breast cancer biomarker CA 15-3. *Biosensors and Bioelectronics* 2013; 43:25-29.
68. Frago A, Latta D, Laboria N, Germar Fv, Hansen-Hagge TE, Kemmner W, Gärtner C, Klemm R, Drese KS, O'Sullivan CK. Integrated microfluidic platform for the electrochemical detection of breast cancer markers in patient serum samples. *Lab on a Chip* 2011; 11:625-631.
69. Wilson MS, Nie W. Multiplex Measurement of Seven Tumor Markers Using an Electrochemical Protein Chip. *Analytical Chemistry* 2006; 78:6476-6483.
70. Rossi LM, Shi L, Rosenzweig N, Rosenzweig Z. Fluorescent silica nanospheres for digital counting bioassay of the breast cancer marker HER2/neu. *Biosensors and Bioelectronics* 2006; 21:1900-1906.
71. Metrohm Autolab. New potentiostat / galvanostat: PGSTAT101. [Online: <http://www.metrohm.com.sg>]. [2009 Outubro; Acedido em 2013 Setembro 10].
72. DropSens. General Catalogue. [Catálogo]. Llanera, Espanha: DropSens; 2013.
73. Neves MMPS, González-García MB, Nouws HPA, Costa-García A. Celiac disease detection using a transglutaminase electrochemical immunosensor fabricated on

nanohybrid screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 2012; 31:95-100.

74. Fanjul-Bolado P, Hernández-Santos D, González-García MB, Costa-García A. Alkaline Phosphatase-Catalyzed Silver Deposition for Electrochemical Detection. *Analytical Chemistry* 2007; 79:5272-5277.
75. Neves M. Development of electrochemical immunosensors for celiac disease clinical diagnosis and gluten-free food control. [Doutoramento]. Porto: Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia; 2012.
76. Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 4^a ed. Harlow, Inglaterra: Prentice Hall; 2000.
77. International Organization for Standardization. *Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*. [ISO 8466-1:1990]. Genebra, Suíça; 1990.